



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

QUEILA CRISTINA DIAS

Características dos Tratamentos e seus Efeitos na Sobrevida de ratos induzidos quimicamente ao Câncer de Bexiga Urinária não-músculo invasivo (CBNMI): Novas Perspectivas Terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad (MRB-CFI-1) e Cisplatina

CAMPINAS

2020

QUEILA CRISTINA DIAS

Características dos Tratamentos e seus Efeitos na Sobrevida de ratos induzidos quimicamente ao Câncer de Bexiga Urinária não-músculo invasivo (CBNMI): Novas Perspectivas Terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad (MRB-CFI-1) e Cisplatina

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. WAGNER JOSE FAVARO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA QUEILA CRISTINA DIAS E ORIENTADA PELO PROF. DR. WAGNER JOSE FAVARO.

CAMPINAS

2020

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

D543c Dias, Queila Cristina, 1985-
Características dos tratamentos e seus efeitos na sobrevida de ratos induzidos quimicamente ao câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) : novas perspectivas terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad (MRB-CFI-1) e cisplatina / Queila Cristina Dias. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Wagner José Fávaro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neoplasias da bexiga. 2. Imunoterapia. 3. OncoTherad. 4. Cisplatino. I. Fávaro, Wagner José, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characteristics of treatment and their effects on the survival of rats chemically induced to non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) : new therapeutic perspectives based on the use of OncoTherad (MRB-CFI-1) and cisplatin

Palavras-chave em inglês:

Bladder neoplasms

Immunotherapy

OncoTherad

Cisplatin

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Wagner José Fávaro [Orientador]

Jose Carlos Souza Trindade Filho

Joaquim Murray Bustorff Silva

Ângela Cristina Malheiros Luzo

Alexandra Pinheiro Fantinatti

Data de defesa: 30-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1522-6400>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7746540825644033>

Campinas, 30 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Jose Favaro

Dr. Jose Carlos Souza Trindade Filho

Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorf Silva

Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

Dra. Alexandra Pinheiro Fantinatti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unidade Instituto de Biologia (IB/UNICAMP).

Dedico este trabalho à todos os pacientes que iniciaram o tratamento com o OncoTherad, confiando no nosso trabalho e depositando em nós sua última esperança e vontade de viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, provedor de todas as coisas.

À minha família. Minha mãe, sempre presente, me apoiando e me incentivando, meu ombro amigo e que sempre acreditou no meu potencial (até mesmo quando eu duvidava). Meu pai, minhas irmãs e meus sobrinhos que estão sempre na torcida, comemorando cada conquista, confortando nas derrotas, me apoiando e me lembrando sempre quanto eu sou abençoada por estar rodeada de amor verdadeiro. Minha base, amo vocês!

À UNICAMP pela formação e pelas inúmeras oportunidades, e também à CAPES pelo suporte financeiro.

Ao meu querido orientador Prof. Wágner Fávaro, por todo o crescimento profissional que me proporcionou durante esses anos, também pela confiança e parceria, por ser a definição de “melhor pessoa”, por ter esse imenso coração que o faz querer ajudar à todos. Minha eterna gratidão e admiração!

À equipe LCURGIM por tornarem o dia-a-dia no laboratório cada vez mais agradável. Em especial agradeço a parceria dos meus queridos amigos Marcela Durán, Leandro e Matheus que me ajudaram na manutenção e bem estar dos animais experimentais. Ao Cinza por ser sempre solícito e me ajudar com as técnicas, com o manuseio dos equipamentos e no que mais fosse preciso. À Catharina, que sempre esteve à disposição e me ajudou quando eu mais precisava. À Bianca que me auxiliou e fez contribuições primordiais para este trabalho. Serei eternamente grata!

À Melissa, minha amiga e parceira de laboratório, a qual eu tive o prazer de co-orientar dois projetos de IC. É com ela que eu divido todo o sucesso e os frutos deste trabalho! Agradeço pelo comprometimento, interesse, disponibilidade, bom humor, pelo carinho e cuidado com os animais e com os nossos experimentos, pela nossa parceria de sucesso. Não tenho palavras para agradecer essa sintonia de quase 3 anos e por onde eu for lembrarei de você com muito carinho e admiração.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia que sempre me atenderam com um sorriso no rosto, em especial aos amigos Walter, Paulão, Roberto e ao saudoso Marquinhos. Poder contar com pessoas como vocês faz toda a diferença no dia-a-dia.

E aos meus amigos, em especial àqueles amigos-irmãos que me fortaleceram todos os dias, Dani, Ana Elisa, Mari, Lufe, Adriele, Renata, Thaís Qfase, Samantha e Rafael Kashi, essa trajetória foi muito mais leve com vocês!!

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

Muito Obrigada!

RESUMO

O câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) representa 70% dos carcinomas uroteliais e embora tenham uma sobrevivência prolongada, os pacientes que sofrem desta doença apresentam alta taxa de recorrência e progressão tumoral. O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral (RTU), seguido da imunoterapia intravesical com Bacillus Calmette-Guerin (BCG), no entanto, o uso do BCG associa-se à efeitos colaterais em mais de 90% dos pacientes tratados. A incidência de efeitos adversos é reduzida com os quimioterápicos, entretanto a recorrência tumoral ainda é elevada. Diante deste cenário, tratamentos alternativos têm sido propostos para o tratamento do CBNMI, sendo assim, combinações de modalidades terapêuticas, tais como a administração de agentes quimioterápicos, como a Cisplatina por exemplo, e a imunoterapia com OncoTherad (MRB-CFI-1) podem constituir uma promissora alternativa terapêutica para o CBNMI na falha ou recidiva do BCG. Assim, os objetivos deste estudo foram caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos das estratégias terapêuticas utilizando Cisplatina e OncoTherad (MRB-CFI-1), isolados e em combinação, no tratamento do CBNMI induzido quimicamente em ratos, bem como estabelecer a interação destas estratégias terapêuticas com os principais marcadores prognósticos do CBNMI na sobrevida - 30, 90 e 180 dias - pós-tratamento. Nossos resultados demonstraram que as estratégias terapêuticas testadas neste estudo foram eficazes no tratamento do CBNMI, pois não promoveram perda de peso corporal, promoveram inibição da progressão tumoral e apresentaram taxas de sobrevida maiores do que as estimadas para os doentes que sofrem dessa neoplasia. Além disso, nas análises de Imunomarcacão observamos que o tratamento com OncoTherad promove o aumento na imunorreatividade de proteínas reguladoras, como PTEN e p21, além da diminuição da imunorreatividade da proteína p53, demonstrando a contribuição positiva do OncoTherad na regulação do ciclo celular. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que as estratégias terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad e Cisplatina, isolado ou em combinação, podem constituir uma promissora alternativa para o tratamento do CBNMI.

ABSTRACT

Non-muscle-invasive urinary bladder cancer (NMIBC) represents 70% of the urothelial carcinomas and although the patients suffering from this disease have a prolonged survival, they present a high rate of tumor recurrence and progression. The primary treatment of NMIBC is surgical treatment through transurethral resection (TUR), followed by intravesical immunotherapy with Bacillus Calmette-Guerin (BCG), without regard to the fact that the use of BCG is associated with side effects in more than 90% treated patients. The incidence of adverse effects is reduced with chemotherapy, however, tumor recurrence is still high. In view of this scenario, alternative treatments for NMIBC have been proposed: combinations of therapeutic modalities, such as the administration of chemotherapeutic agents, Cisplatin for example, and immunotherapy with OncoTherad (MRB-CFI-1) may constitute a promising therapeutic alternative for NMIBC in BCG failure or relapse. Thus, the objectives of this study were to characterize and compare the histopathological effects of therapeutic strategies using Cisplatin and OncoTherad (MRB-CFI-1), isolated or in combination, in the treatment of chemically induced NMIBC in rats, as well as to establish the interaction of these therapeutic strategies with the main prognostic markers of NMIBC in survival - 30, 90 and 180 days - post-treatment. Our results demonstrated that the therapeutic strategies tested in this study were effective in the treatment of NMIBC, as they did not promote loss of body weight, promoted inhibition of tumor progression and had higher survival rates than those estimated for patients suffering from this neoplasm. In addition, in Immunomarking analyzes, we observed that treatment with OncoTherad promotes an increase in the immunoreactivity of regulatory proteins, such as PTEN and p21, in addition to a decrease in the immunoreactivity of the p53 protein, demonstrating the positive contribution of OncoTherad in the regulation of the cell cycle. In view of the results obtained, we can conclude that therapeutic strategies based on the use of OncoTherad and Cisplatin, isolated or in combination, can constitute a promising alternative for the treatment of NMIBC.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de Tratamento dos diferentes grupos experimentais.....	43
Figura 2. Imagens do exame de ultrassonografia da bexigas urinárias dos grupos experimentais.....	47
Figura 3. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	51
Figura 4. Gráfico da variação de peso corporal (g) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos durante todo o período experimental.....	55
Figura 5. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos animais experimentais SV30.....	61
Figura 6. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos experimentais SV90.....	66
Figura 7. Indução do CBNMI do Grupo Experimental ENU-Câncer.....	68
Figura 8. Fotomicrografias das lesões uroteliais do Grupo ENU-Câncer.....	69
Figura 9. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos experimentais SV180.....	73
Figura 10. Imunomarcção para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	77
Figura 11. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	79
Figura 12. Imunomarcção para os antígenos Pi3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	80
Figura 13. Imunomarcção para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30.....	82
Figura 14. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30.....	83
Figura 15. Imunomarcção para os antígenos Pi3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30.....	84
Figura 16. Imunomarcção para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90.....	86

Figura 17. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90.....	87
Figura 18. Imunomarcção para os antígenos PI3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90.....	88
Figura 19. Imunomarcção para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180.....	90
Figura 20. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180.....	91
Figura 21. Imunomarcção para os antígenos PI3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180.....	92
Figura 22. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários p53 e p21 nos diferentes grupos experimentais.....	100
Figura 23. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários PTEN e HRAS-KRAS nos diferentes grupos experimentais.....	101
Figura 24. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários Pi3K, AKT e mTOR nos diferentes grupos experimentais.....	102

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação.....	46
Tabela 2. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	50
Tabela 3. Análise Macroscópica do trato urinário dos animais experimentais Pós-Tratamento.....	52
Tabela 4. Dados de peso corporal (g), consumo semanal de ração (g) e consumo de água (ml) por animal dos grupos experimentais nos diferentes períodos e tratamentos.....	57
Tabela 5. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV30.....	60
Tabela 6. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV30..	62
Tabela 7. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV90..	65
Tabela 8. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV90..	67
Tabela 9. Taxa de Mortalidade e Sobrevida dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - SV180.....	70
Tabela 10. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - SV180.....	72
Tabela 11. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV180.....	74
Tabela 12 Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais Pós-Tratamento.....	76
Tabela 13: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais SV30.....	81
Tabela 14: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais SV90.....	85

Tabela 15: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais SV180.....	89
Tabela 16: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com OncoTherad IP.....	95
Tabela 17: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com OncoTherad IV.....	96
Tabela 18: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com Cisplatina.....	98
Tabela 19: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com Cisplatina+OncoTherad.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - (sinônimo de PKB) Proteína quinase B

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

BCG - Bacillus Calmette-Guerin

CB - Carcinoma da bexiga urinária

CBNMI - Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo

CDK - Quinase dependente de ciclina

CFI-1 - Complexo Fosfato Inorgânico-1

ENU - N-etil-N-nitrosourea

IP - via intraperitoneal

IPT - inibição da progressão tumoral

IV - via intravesical

MDM2 - Mouse Double Minute 2

MDSC - células supressoras derivadas da linhagem mielóide

MNU - N-metil-N-nitrosouréia

MRB-CFI-1 - Modificador de Resposta Biológica - Complexo Fosfato Inorgânico-1
(OncoTherad)

mTor - (*mammalian target of rapamycin*) Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

P14-16 - parte proteica do OncoTherad

p53 - (fator de transcrição codificado pelo gene TP53) proteína reguladora da apoptose

PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular

PCT - Tratado de Cooperação de Patentes

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2 - fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3 - fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

P-MAPA - Agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio

Pt - Platina

pT1 - Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria

pTa - Carcinoma (urotelial) papilífero não-músculo invasivo

PTEN - (*phosphatase and tensin homolog*) homólogo da fosfatase e tensina

pTis - Carcinoma in situ

RAS - Gene do Sarcoma do rato

RTU - Ressecção transuretral

STING - Fator Estimulante do Complexo Interferon

SV30 - Sobrevida 30 dias após o término do tratamento

SV90 - Sobrevida 90 dias após o término do tratamento

SV180 - Sobrevida 180 dias após o término do tratamento

TLRs - Receptores Toll-like

TP53 - gene que codifica a proteína p53

TSC - complexo esclerose tuberosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 - Carcinoma de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI).....	16
1.2 - Perspectivas Terapêuticas para o Carcinoma de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI).....	19
1.3 - Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral no CBNMI.....	26
1.4 - Sinalização Celular e o Câncer de Bexiga.....	28
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 - Animais e Procedimento Experimental.....	41
3.2 - Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral.....	43
3.3 - Análises Histopatológicas	44
3.4 - Imunomarcação dos Antígenos: P53, P21, HRAS-KRAS, PTEN, PI3K, Akt e mTOR.....	44
3.5 - Análises Estatísticas.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais Pós-Tratamento com OncoTherad ou Cisplatina.....	48
4.2 - Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral.....	53
4.2.1 - Peso Corporal e Consumo de Água e Ração dos grupos experimentais.....	53
4.2.2 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV30.....	58
4.2.3 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV90.....	63
4.2.4 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV180.....	71
4.3 - Análises de Imunohistoquímica dos diferentes grupos experimentais.....	75
4.3.1 - Análises das Imunohistoquímicas dos Grupos experimentais Pós-Tratamento.....	75
4.3.2 - Análises das imunohistoquímicas dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral.....	81
4.3.3 - Análise das Imunohistoquímicas de cada estratégia terapêutica em diferentes períodos experimentais.....	93
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÃO	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
8. ANEXOS.....	137

1. INTRODUÇÃO

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

O carcinoma de bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (Altekruse et al., 2010; Zhang et al., 2011; Siegel et al., 2012). De acordo com a Associação Europeia de Urologia o CB é considerado comum, sendo o décimo primeiro câncer mais diagnosticado em todo o mundo (Babjuk et al., 2016). Globalmente, a cada ano, cerca de 400 000 novos pacientes são diagnosticados com CB e mais de 150 000 morrem da doença (Rafnar et al., 2011). Para 2019 a Sociedade Americana para o Câncer estimou cerca de 80.470 novos casos de CB nos Estados Unidos, sendo 61.700 em homens e 18.770 em mulheres, além de prever 17.670 mortes por CB, sendo 12.870 homens e 4.800 mulheres (American Cancer Society, 2019). Já para o Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no biênio de 2018 a 2019 serão 9.480 novos casos de CB por ano, sendo 6.690 homens e 2.790 mulheres. Em 2017 foram notificadas 4.355 mortes por CB, sendo 3.021 homens e 1.334 mulheres, o que demonstra o drástico aumento na prevalência desse tipo de tumor (INCA, 2019).

A incidência do CB vem aumentando progressivamente e, apesar de poder ocorrer em qualquer idade, a incidência de câncer de bexiga aumenta diretamente com a idade, sendo o diagnóstico mais frequente na 6ª e 7ª décadas de vida. Entretanto, embora as taxas de incidência tenham aumentado levemente desde os anos 80, as taxas de mortalidade pelo CB têm diminuído, talvez devido à detecção precoce, cirurgias menos agressivas, quimioterapia combinada e aumento do uso da imunoterapia (Netto Jr. et al., 1999). Em geral, o CB é cerca de 3 a 4 vezes mais comum em homens do que em mulheres, porém a sobrevida das mulheres é pior com esse tipo de tumor, e especula-se que a alta agressividade do CB nas mulheres é decorrente do desbalanço hormonal, que surge a partir da quinta década de vida, pois embora a bexiga urinária seja secundariamente regulada por hormônios sexuais esteroides, o urotélio normal e os tumores uroteliais são responsivos aos andrógenos e estrógenos (Garcia et al., 2015).

Estruturalmente, a bexiga de mamíferos caracteriza-se por ser um órgão oco, com a parede compreendendo as camadas serosa, muscular, sub-mucosa, mucosa e lâmina própria, com uma camada de células epiteliais transicionais de origem endodermal cobrindo a superfície interna da bexiga urinária, denominada urotélio (Lewis, 2000). O mecanismo para o desenvolvimento do CB tem como origem a hiperplasia urotelial, progredindo para atipia e posterior desenvolvimento da neoplasia. Mais de 70% da incidência de CB é superficial, tumor não-músculo invasivo (CBNMI), ou seja, que se restringe ao urotélio, e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Kroft & Oyasu, 1994; Montironi & Lopez-Beltran, 2005; Reis et al., 2009; Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Nos pacientes que apresentam a doença não-músculo invasiva (CBNMI), os tumores superficiais são classificados em três estágios: pTis - carcinoma *in situ*; pTa – carcinoma papilífero sem invasão da lâmina própria e pT1 - tumor confinado a mucosa e submucosa da bexiga, invade o tecido conjuntivo, mas não a camada muscular da bexiga (Ro et al., 1992; Epstein et al., 1998), ocorrendo em 10%, 70% e 20%, respectivamente (INCA, 2018). Embora tenham uma sobrevivência prolongada, estes pacientes sofrem de uma alta taxa de recorrência do tumor. Desta forma, a natureza recidivante do CB representa um enorme fardo sobre os sistemas de cuidados de saúde, uma vez que, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em até 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Shimada et al., 2011; Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Atualmente, a modalidade padrão de tratamento para CB invasivo é cistectomia radical e a quimioterapia sistêmica é geralmente reservada para pacientes com doença metastática, no entanto estes regimes de tratamento fornecem apenas um benefício limitado e são raros os casos de remissão completa.

O motivo para o aumento nos casos de CB pode estar ligado à alguns hábitos, situações ou características genéticas dos pacientes, que apresentam predisposição ao desenvolvimento da doença. A primeira correlação etiológica estabelecida para o CBNMI foi descrita em 1975, quando Hunstein e Rehn observaram uma incidência maior desta doença em indivíduos que trabalhavam em indústrias químicas na Alemanha. Desde então, o melhor conhecimento da biologia molecular permitiu a identificação de vários fatores envolvidos na carcinogênese, no diagnóstico, na progressão, na recorrência e nos fatores que determinam a metastização dos

tumores de bexiga (Ferreira & Rocha, 2004). O câncer de bexiga é um dos principais e mais conhecidos exemplos de carcinogênese de contato. Carcinógenos absorvidos pela pele, inalados ou ingeridos via oral têm seu mecanismo de excreção via renal e com isso são concentrados na urina, entrando, portanto, em contato com o urotélio muitas vezes em altas concentrações. Com essa exposição, o urotélio sofre alterações pré-neoplásicas (displasias) que podem permanecer definitivamente como tal ou então progredir para neoplasia estabelecida, na dependência da continuidade do estímulo (Ferreira & Rocha, 2004). Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento do CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. Cerca de 20% dos casos de câncer de bexiga estão associados à exposição ocupacional a aminas aromáticas e a substâncias químicas orgânicas em uma série de atividades profissionais. Os produtos químicos ligados ao maior risco de desenvolver a doença incluem arsênico e produtos químicos utilizados na fabricação de tintas, borracha, couro, têxteis e produtos de pintura. No entanto, segundo dados do registro da base populacional do INCA o maior fator de risco para o desenvolvimento do CB é o tabagismo, sendo responsável por cerca de 66% de novos casos em homens e 30% em mulheres (INCA, 2018). Na meta-análise de estudos epidemiológicos de Zeegers et al. (2000) sobre o impacto das características do tabagismo ao risco de câncer do trato urinário, o cigarro foi apontado como um fator que aumenta substancialmente o risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga. A fumaça do cigarro de tabaco contém cerca de 4.700 substâncias químicas, muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos N-nitrosos e aminas aromáticas. A urina dos fumantes tem mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada com os compostos encontrados na urina de não-fumantes (Grimmer et al., 2000).

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos no período de algumas semanas de tratamento com doses baixas de carcinógenos químicos (Crallan et al., 2006; Reis et al., 2009) que são instilados diretamente na bexiga dos animais (Crallan et al., 2006). Em 1972, Hicks & Wakefield utilizaram quatro doses de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) para rápida indução do CBNMI em ratos, demonstrando que o MNU é um carcinógeno completo. O MNU

pode atuar como iniciador e promotor da neoplasia podendo causar persistente metilação do DNA (Steinberg et al., 1990). Além disso, o MNU é conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica (Steinberg et al., 1990). Posteriormente, este modelo foi modificado e reproduziu tumores de bexiga que são clinicamente observados em humanos, os quais tiveram origem exclusiva no urotélio, foram espontâneos e não-implantados e histologicamente equivalentes ao carcinoma de células transicionais, sendo, portanto, um importante modelo para o estudo do CBNMI (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2010).

Os modelos animais para carcinogênese de bexiga apresentam características semelhantes ao CBNMI desenvolvido em humanos (Reis et al., 2009). A carcinogênese urotelial em roedores sofre uma sequência de alterações morfológicas, iniciando com hiperplasia simples seguida de hiperplasia nodular e papilar (Oliveira et al., 2006), progredindo posteriormente para papiloma e, ocasionalmente, carcinomas não-invasivos e, finalmente, a neoplasias invasivas (Oyasu, 1995; Cohen, 2002). Muitos tumores exofíticos induzidos em ratos são polipóides, geralmente pedunculados e com um padrão de crescimento papilar invertido (Oyasu, 1995; Cohen, 2002). A hiperplasia nodular em camundongos é consideravelmente mais comum do que as proliferações papilíferas, ocorrendo com certa frequência com ausência completa de hiperplasia papilar (Fukushima et al., 1981). A estrutura e função do trato urinário inferior de roedores são semelhantes à dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CBNMI, o que faz dos roedores um excelente modelo experimental para o CB (Williams et al., 2008).

1.2 - Perspectivas Terapêuticas para o Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral (RTU), seguido da imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), para diminuição da recidiva e prevenção da progressão tumoral (Askeland et al., 2012). Os procedimentos cirúrgicos periódicos para a

ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida e fazem com que os pacientes sejam considerados grupo de risco para o desenvolvimento neoplásico de novo. O câncer vesical, caracterizado por lesões superficiais (CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (Askeland et al., 2012), 20% - 30% desses tumores apresentam progressão e 70% recorrência pós-tratamento exclusivo com RTU (Kemp et al., 2005; Askeland et al., 2012). Por outro lado, sabe-se que a terapia adjuvante com BCG diminuiu esses índices para 30% (Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012).

Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas & Brandau, 2003; Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012). Entretanto, atualmente há uma questão que dificulta o uso do BCG, em 2016 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Resolução RE3.403/2016 determinou a suspensão da fabricação das vacinas BCG e Imuno BCG da Fundação Ataulpho de Paiva (RJ), a única que produzia o medicamento no Brasil. Desde então, a disponibilidade desta imunoterapia tem sido afetada, uma vez que a importação de medicamentos baseados em organismos vivos ou atenuados como o BCG requer cuidado extremo e vigilância, encarecendo o processo. A falta de BCG representa um impacto negativo no tratamento dos pacientes com câncer de bexiga. Sem essa vacina, tais pacientes possuem alto risco de recidiva e progressão tumoral.

De acordo com Schamhart et al. (2000), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de 1 ano. Contudo, tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (Schamhart et al., 2000). Ainda, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG,

sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (Lamm et al., 1986; Sylvester et al., 2002; Bhole & Brandau, 2003). No entanto, o uso de BCG é limitado no CBNMI, não apenas pelos efeitos colaterais, mas também por falha do tratamento e intolerância que ocorrem em mais de dois terços de todos os pacientes (Packiam et al., 2017).

Os agentes quimioterápicos promovem menor incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos, comparado ao BCG. No entanto, a resposta à quimioterapia intravesical no tratamento do CBNMI é incompleta e a recorrência tumoral é elevada (superior a 80%) em pacientes com doença não-músculo invasiva (Zhang et al., 2012).

Compostos que formam ligações químicas com o DNA representam classes importantes de compostos antitumorais. Um grande número destes compostos têm sido sintetizados e testados para atividade antineoplásica, e muitos deles já estão em uso clínico. As interações entre os compostos quimioterápicos e o DNA têm um papel muito importante em diversos eventos celulares. De fato, o DNA pode ser considerado como o principal receptor macromolecular para estas substâncias, pois existem diversas classes de compostos antineoplásicos que agem sobre o DNA. Alguns formam complexos não covalentes com o DNA, tais como a daunorubicina, a doxorubicina e a distamicina. Outros compostos, entre eles a cisplatina e a mitomicina C, formam ligações covalentes com o DNA (Yang & Wang, 1999). Os sinais primários da ação de tais medicamentos são as alterações no DNA que levam a eventos moleculares que podem resultar em bloqueio na progressão do ciclo celular e apoptose, os quais são respostas essenciais à manutenção da integridade genética da célula normal.

Outra classe de fármacos antineoplásicos são os anticancerígenos à base de metais, cujo interesse em seu desenvolvimento aumentou desde a descoberta da atividade biológica da cisplatina [Cis-diamino-dicloro-platina (II)] para o tratamento de tumores sólidos (Zhang et al., 2012). Estes fármacos são, basicamente, complexos

metálicos que possuem a capacidade de se ligarem as nucleobases do DNA e clivar a molécula de DNA hidroliticamente ou oxidativamente. Se o dano ao DNA for irreparável ou se os fatores de transcrição do ciclo celular forem bloqueados, a célula afetada, em seguida, sofre apoptose.

No entanto, muitos estudos clínicos revelam que os benefícios da terapia baseada nos agentes quimioterápicos não superam os riscos de recidiva e os altos índices de efeitos colaterais causados no tratamento do CBNMI (Perabo et al., 2005). Desta forma, o tratamento do CBNMI continua sendo um desafio, uma vez que a recorrência e progressão da doença, bem como os efeitos colaterais associados às modalidades terapêuticas disponíveis, ainda estão presentes (Malmström, 2017).

Neste contexto, tratamentos alternativos utilizando imunomoduladores e modificadores de resposta biológica têm sido propostos com resultados promissores para o tratamento de diversos carcinomas, incluindo o CB. Considerando que o CB é sensível tanto à imunoterapia quanto à quimioterapia, os compostos que ativam o sistema imunológico (incluindo vacinas, modificadores de resposta biológica, moduladores do ambiente tumoral, entre outros) podem ser usados sozinhos ou em combinação com os agentes quimioterápicos sistêmicos, com o objetivo de obter um maior efeito terapêutico adicionado à menor toxicidade. Assim, a combinação de modalidades terapêuticas, tais como a administração de agentes quimioterápicos, como a Cisplatina, associados à imunoterapia pode constituir uma promissora alternativa terapêutica na falha ou recidiva do BCG para o CBNMI.

Quimioterapia com Cisplatina no tratamento do CB

A Cisplatina age como um antineoplásico que tem uma gama grande de atividades, podendo ser administrada sozinha ou com outras drogas, amplificando seu efeito (Chuffa et al., 2018). A introdução da Cisplatina em protocolos quimioterapêuticos foi altamente benéfica para o tratamento de diversos tipos de tumores. Este quimioterápico é efetivo no tratamento de tumores como os carcinomas de testículo, de ovário e de bexiga urinária, além de uma variedade de

outras neoplasias, como o câncer de cérvix uterino, de cabeça e pescoço, de esôfago e de pulmão (Giaccone, 2000). Além disso, a Cisplatina é efetiva em 40 a 60% dos pacientes com câncer metastático de bexiga urinária (Sonpavde & Petrylak, 2005). Os mecanismos bioquímicos da citotoxicidade da Cisplatina envolvem a sua ligação ao DNA e a outros componentes celulares, com a subsequente indução da morte celular por apoptose, por necrose ou por ambos os mecanismos (González et al., 2001). A Cisplatina forma um aduto Platina-DNA na posição N7 da guanina, originando ligações cruzadas intracadeias 1,2-d(GpG) e 1,2-d(ApG), e também ligações intercadeias, assim ativa as proteínas em resposta ao dano. Estas proteínas, por sua vez inibem a quinase dependente de ciclina (CDK) e, finalmente, as células sofrem apoptose via p53. Tais adutos podem levar a formação de falhas e quebras de dupla fita e promover uma variedade de respostas celulares, incluindo, por exemplo, a inibição da síntese de DNA (Mello et al., 1998).

Apesar do sucesso da Cisplatina, existem sérias preocupações com o uso deste fármaco devido sua toxicidade, resistência intrínseca, estreito espectro de ação para certos fenótipos de câncer e adesão do paciente ao tratamento. A Cisplatina é altamente tóxica e sua aplicação é limitada por seus severos efeitos colaterais, que incluem a citotoxicidade (Blasiak et al., 1999), nefrotoxicidade (Goldstein & Mayor, 1983), ototoxicidade e perda auditiva (Vermorken et al., 1983), neurotoxicidade (Schattschneider et al., 2001), mielotoxicidade (Badari-Osama et al., 2000), mielosupressão e anemia (Canaparo et al., 2000), além de graves efeitos sobre o trato gastro-intestinal (Hidaka et al., 1995). A Cisplatina apresenta também atividade mutagênica (Turnbull et al., 1979), carcinogênica (Leopold et al., 1979) e teratogênica (Mazur et al., 2000). Assim, estudos sobre o seu potencial carcinogênico sugerem que este composto químico é um carcinógeno humano em potencial, além da existência de um elevado risco de indução de tumores secundários em pacientes que sobreviveram por longos períodos após o tratamento quimioterápico com Cisplatina (Turnbull et al., 1979). Em seres humanos, uma relação direta entre a utilização de Cisplatina e o aumento no risco de desenvolvimento de tumores secundários após a quimioterapia não foi ainda completamente estabelecida. Contudo, estudos relativos aos elementos metálicos

essenciais têm recebido muita atenção em contraste a platina (Pt), uma vez que os medicamentos desenvolvidos e sintetizados a partir de íons metálicos endógenos podem ser menos prejudiciais e mais propensos a atividade antiproliferativa contra tumores (Tabassum et al., 2012).

Ainda, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em ratos induzidos quimicamente ao CBNMI demonstraram que a associação entre a Cisplatina e a imunoterapia intravesical com P-MAPA promoveram a diminuição da proliferação de células tumorais uroteliais (Dias et al., 2016). Evidenciando que a combinação de imunoterapia intravesical e Cisplatina sistêmica no modelo animal CBNMI foi eficaz, bem tolerada e não mostrou sinais aparentes de antagonismo entre as drogas.

OncoTherad: Modificador de Resposta Biológica (MRB-CFI-1)

Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como modificadores de resposta biológica, nosso laboratório em parceria com o NANOBIOS (Instituto de Química – UNICAMP), liderado pelo Prof. Nelson Duran, desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado OncoTherad, ou MRB-CFI-1 (Modificador de Resposta Biológica - Complexo Fosfato Inorgânico 1). O OncoTherad é um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos associado a uma proteína glicosídica, com tamanho entre 420-530nm, fórmula química: $C_{14}NO_8Mg_2(PO_4)_2$ e que possui patente depositada na fase inicial nacional do PCT (**Número: BR 1020170127680**) pela agência de inovação INOVA – UNICAMP (Fávaro & Durán, 2017).

Uma possível hipótese do mecanismo de ação do OncoTherad desencadear a estimulação do sistema imune é a fosforilação de aminoácidos hidroxilados como serina, treonina e tirosina por compostos que apresentam sais de fosfato. Ainda, uma outra hipótese do mecanismo de ação do OncoTherad é a ativação local do sistema imune no microambiente tumoral. A literatura especializada tem demonstrado que a administração intratumoral de determinados compostos de fosfatos ativam o sistema imune no microambiente tumoral, levando à uma importante regressão tumoral (Shirota et al., 2012; Corrales et al., 2015). Shirota et

al. (2012) demonstraram que a administração intratumoral de oligonucleotídeos CpG reduzem a atividade imunossupressora de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC). Ainda, esses mesmos autores verificaram que as MDSC monocíticas do microambiente tumoral expressaram TLRs e responderam à estimulação de oligonucleotídeos CpG por intermédio da perda de sua capacidade de suprimir a função das células T, pela produção de citocinas Th1 e de sua diferenciação em macrófagos com capacidade tumoricida, contribuindo para a regressão tumoral. Similarmente, Corrales et al. (2015) demonstraram que a administração intratumoral de derivados dinucleotídeos cíclicos sintéticos ativaram o fator estimulador do complexo de genes de interferon (STING), induzindo uma significativa regressão de tumores estabelecidos em camundongos, bem como promoveram uma substancial reposta imune sistêmica que foi capaz de eliminar/reduzir as metástases à distância.

Para verificar se o OncoTherad era capaz de deflagrar a resposta inflamatória local (ativação local do sistema imune), nosso grupo de pesquisa avaliou a administração intraperitoneal do OncoTherad em ratas Fischer 344. Os resultados preliminares revelaram que após a aplicação de 3 doses, uma a cada 72 horas, os animais tratados com OncoTherad, apresentaram intensa inflamação peritoneal caracterizada pelo aumento do rubor, da vascularização e dos pontos hemorrágicos. Além disso, verificou-se aumento dos depósitos de cristais de fosfatos na cavidade abdominal (Fávaro & Durán, 2017). Assim, tais resultados revelaram que o OncoTherad foi capaz de induzir a resposta inflamatória local, o que justifica sua avaliação como imunomodulador nos experimentos em animais com CBNMI induzidos quimicamente.

Após o experimento de indução da resposta inflamatória local em ratos saudáveis, nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial antitumoral e imunomodulatório em ratas Fischer 334 induzidas quimicamente ao CBNMI bem como avaliou a segurança do produto (Fávaro & Durán, 2017). Os resultados demonstraram que a toxicidade *in vitro* do nanocomposto OncoTherad nas células de carcinoma de bexiga urinária grau II (linhagem celular 5637) foi baixa (viabilidade celular de 75%), indicando que o provável mecanismo de morte das células neoplásicas pelo OncoTherad é dependente da ativação do sistema imune. Este estudo demonstrou que a

imunoterapia com o nanofármaco OncoTherad, na dose terapêutica de 20mg/Kg, não causou efeitos colaterais, como hematúria macroscópica, hiperplasia urotelial e inflamação intensa na bexiga, ureteres e rins, bem como não mostrou sinais de inflamação e/ou de toxicidade sistêmica no fígado, baço, estômago e pâncreas. Além disso, o tratamento com OncoTherad não mostrou sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade sendo que os níveis séricos de AST, ALT, Fosfatase Alcalina, Uréia e Creatinina estavam dentro dos limites de normalidade (Fávaro & Durán, 2017).

Em conjunto, os estudos preliminares demonstraram que o OncoTherad foi capaz de impedir a progressão tumoral na bexiga urinária dos animais, além de promover baixa taxa de mortalidade (não há mortalidade até o final do tratamento) e ganho de peso corporal dos animais após o início do tratamento.

Contudo, os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa justificam a necessidade de pesquisas que caracterizem a estrutura química e os mecanismos antitumorais e imunomodulatórios do OncoTherad, objetivando posicionar esse composto como uma possível alternativa terapêutica para o CBNMI.

1.3 - Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral no CBNMI

O comportamento recidivante torna o CBNMI uma das doenças mais caras para tratar, com um custo estimado de US\$ 96.000 a US\$ 187.000 por paciente desde o diagnóstico até a morte, nos Estados Unidos (Botteman, et al.,2003). Além disso, os procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida e fazem com que os pacientes sejam considerados grupo de risco para o desenvolvimento neoplásico de novo. Diante deste cenário, em que novas estratégias terapêuticas mais eficazes tem sido propostas para o tratamento do CB, estudos que avaliem a sobrevida pós-tratamento se tornam cada vez mais necessários.

O Teste de sobrevida e regressão/progressão tumoral pós-tratamento, neste estudo que descreve resultados obtidos com animais experimentais, tem como objetivo analisar e comparar a sobrevida dos animais submetidos às diferentes estratégias terapêuticas, considerando fatores que refletem a qualidade de vida do animal doente, tais como ganho/perda de peso corporal, variações no consumo de

água e ração, outras alterações no trato urinário (presença de cálculos vesicais/renais, hidroureter e hematuria), a regressão/progressão do tumor vesical, e o tempo de vida dos animais.

Segundo Consenso nacional de nutrição oncológica/Instituto Nacional de Câncer (CNNO/INCA 2009), a perda de peso e a desnutrição são os distúrbios nutricionais frequentemente observados em pacientes com câncer (40% a 80% dos casos), sendo que até 30% dos pacientes adultos apresentam perda superior a 10% do peso. Os principais fatores determinantes da desnutrição nesses indivíduos são a redução na ingestão total de alimentos, as alterações metabólicas provocadas pelo tumor e o aumento da demanda calórica pelo crescimento do tumor. Durante o tratamento antitumoral, os pacientes oncológicos podem evoluir para desnutrição moderada ou grave e cerca de 20% desses pacientes morrem em decorrência da desnutrição e não da doença maligna (Ottery, 1994). A desnutrição leva ao aumento da morbimortalidade e da toxicidade causada pela estratégia terapêutica usada, resultando em aumento no tempo de internação e dos custos hospitalares. Tudo isso prejudica a condição geral do paciente e sua qualidade de vida (Senesse et al., 2008).

O tempo de vida do paciente com CB (desde de o diagnóstico até o óbito) é um fator muito importante para caracterizar a eficiência e das estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento. Atualmente, a taxa de sobrevida é utilizada pelos clínicos como uma forma de auxiliar na discussão do prognóstico de um paciente. As taxas de sobrevida relativa são uma maneira mais precisa de estimar o efeito do câncer na sobrevida, tais taxas comparam os pacientes com CB com as pessoas da população em geral. Por exemplo, se a taxa de sobrevida relativa em 5 anos para um estágio específico de câncer de bexiga é de 90%, isso significa que as pessoas que têm esse câncer são, em média, cerca de 90% mais propensas, do que aquelas que não têm esse câncer, à viver por pelo menos 5 anos após ser diagnosticado. Em outras palavras, as taxas de sobrevida podem lhe dar uma ideia de que porcentagem de pessoas com o mesmo tipo e estágio de câncer ainda estão vivas por um determinado período de tempo (geralmente 5 anos) depois de terem sido diagnosticadas. De acordo com os dados mais recentes, baseado em pessoas diagnosticadas com câncer de bexiga entre 2008 e 2014, quando se incluem todos os

estágios do CB, a taxa de sobrevivência relativa em 5 anos é de 77%, em 10 anos é de 70% e em 15 anos cai para 65% (American Cancer Society, 2018).

Quando utilizamos animais como modelos de doenças humanas, alguns fatores precisam ser analisados para que seja possível fazer uma correlação entre a pesquisa experimental e sua projeção na saúde humana. Comparados aos seres humanos, os ratos têm infância breve e acelerada, desenvolvem-se rapidamente durante a infância e tornam-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de idade. Seres humanos, por outro lado, desenvolvem-se lentamente e não atingem a puberdade até a idade de 12 a 13 anos. A adolescência e juventude do rato é menos acelerada (10,5 dias no rato = 1 ano no humano), e na idade adulta cada mês do rato é aproximadamente equivalente a 2,5 anos humanos (Andreollo et al., 2012). A relação da idade do rato com a idade humana tem sido um fator bastante explorado, uma vez que esses animais são os mais utilizados na pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, no entanto o número de publicações existentes enfocando e aprofundando o assunto é muito escasso.

Os principais objetivos no tratamento de pacientes com CBNMI são prevenir o alto número de recorrências e prevenir a progressão tumoral, uma vez que este tipo de carcinoma apresenta elevada taxa de recidiva e progressão pós tratamento. Sendo assim, o Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral nos permite estimar não só o tempo e a qualidade de vida dos animais tratados, e comparar estes achados com o que a literatura relata para os casos de pacientes humanos, como também avaliar e comparar a evolução do câncer (regressão/progressão tumoral) frente às diferentes estratégias terapêuticas utilizadas.

1.4 - Sinalização Celular e o Câncer de Bexiga

O estudo da relação entre as modalidades terapêuticas e os mecanismos celulares responsáveis pela progressão/regressão tumoral no CB é fundamental para avaliar a eficiência no tratamento da carcinogênese urotelial.

Durante o desenvolvimento do câncer, as células tumorais passam por diversos processos que lhes conferem a capacidade de realizar alta proliferação, invasão do

tecido adjacente e metástase. A desregulação de vias de transdução de sinal decorrente de alterações em genes chamados de supressores ou promotores de tumores faz com que o produto destes genes ganhe ou perca função. O resultado disso é a perda da capacidade da célula em controlar o processo de divisão (Ferreira et al., 2013). Desta forma, o desenvolvimento de fármacos que apresentam como alvos mediadores de vias de transdução de sinal tem se tornado cada vez mais comum na indústria farmacêutica. Nos últimos anos, os avanços nos estudos sobre os mecanismos de transdução de sinal levaram à identificação de moléculas-chave envolvidas nas vias que regulam a sobrevivência celular, apoptose, proliferação e processos associados a tumores, tais como angiogênese e metastatização.

Muitos estudos têm mostrado que numerosas alterações genéticas e moleculares estão presentes no CB, muito embora os mecanismos que levam ao fenótipo maligno não sejam, ainda, completamente entendidos. Sabe-se, no entanto, que o acúmulo de alterações genéticas, e não apenas uma única mutação, é o que vai determinar o comportamento clínico do câncer de bexiga urinária (Kim & Kim, 2006). Genes relacionados à transdução de sinais, ao ciclo celular, à metástase e à inibição da apoptose também aparecem hiperexpressos, em contraste aos genes relacionados à apoptose, às moléculas de adesão e aos genes supressores tumorais que se mostram hipoexpressos (Hao et al., 2002).

Análises genéticas têm mostrado que os oncogenes RAS (correlação com recorrência) e erb-B2 (correlação com sobrevida), o gene supressor tumoral Tp53, que codifica a proteína p53 (correlação com sobrevida, progressão e recorrência) e o fator de crescimento EGF/EGFR (correlação com recorrência e progressão) estão entre os mais importantes marcadores prognóstico para o CB (Kausch & Bohle, 2002). Além disso, a via Pi3K/AKT/mTOR pode regular a invasão do tumor, portanto há hipótese de que variações genéticas nesta via podem afetar a sobrevivência dos pacientes (Chen et al., 2010).

A proteína p53

A proteína p53 é constituída por 393 aminoácidos na sua extensão, apresentando quatro regiões com funções distintas, chamadas domínios da proteína.

O primeiro, chamado de domínio de transativação, está localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal). Está compreendido entre os aminoácidos 28 e 42 e é responsável por regular a expressão de genes que atuam na parada do ciclo celular e na rota de apoptose. Na região central existem quatro domínios de ligação ao DNA, entre os aminoácidos 102 e 292, que possibilitam a ligação de p53 em sítios específicos do DNA. Na extremidade carboxi-terminal (C-terminal), existem dois domínios: o domínio de tetramerização, que se situa entre os aminoácidos 319 a 360, responsável pela formação de tetrâmeros de p53, que é a forma mais ativa (selvagem ou *wild-type*) em transativação; o domínio regulatório, que se situa entre os aminoácidos 364 a 393, cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (Silva et al., 2003).

A p53 faz parte do processo de bloqueio do ciclo celular em casos em que ocorrem danos no DNA da célula, sinalizando o bloqueio no ponto de checagem na G1/S do ciclo. Nas células que apresentam o gene que codifica a p53 mutado e/ou inativação da proteína p53, não ocorre a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA (Cavalcanti Júnior et al., 2002). Essas células geneticamente instáveis tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de células com DNA mutado e consequente transformação neoplásica (Arruda, 2008).

Esta proteína foi descrita pela primeira vez em 1979, formando um complexo com o antígeno T do vírus símio (SV-40), sendo então referida como uma oncoproteína e, em 1989, como gene supressor de tumor (Lane & Crawford, 1979). Desde então, a proteína p53 vem sendo muito estudada, sendo um dos marcadores dos diferentes estágios de diversos tipos de câncer. Mutações no gene que codifica a proteína p53 ocorrem em 50 - 70% das neoplasias humanas, associam-se à pior sobrevida global livre de doença e têm sido implicada na resistência às terapias anticâncer. Ainda, a expressão da p53 mutante indica um prognóstico preditivo (Zornig et al., 2001; Miller et al., 2005).

Sob condições fisiológicas normais, a proteína p53 apresenta uma meia vida muito curta, calculada em seis minutos, tornando difícil sua detecção em razão da rápida degradação, o que não ocorre com o acúmulo da forma mutada no núcleo da

célula, podendo ser facilmente detectada por técnicas de imuno-histoquímica, Western blot, ou por citometria de fluxo (Arruda, 2008).

Para que a proteína p53 desempenhe seu papel de supressor tumoral, a localização nuclear é essencial, no entanto é comum sua marcação citoplasmática nos ensaios de imunohistoquímica. O mecanismo de exportação nuclear de p53 para o citoplasma é promovido pela ação inibidora do oncogene MDM2 (*Mouse Double Minute 2*), que codifica uma proteína de mesmo nome e é um gene ativado por p53. A proteína Mdm2 se associa ao domínio de transativação de p53, inibindo sua transcrição regulatória funcional, o que diminui a indução da apoptose e a parada do ciclo celular.

A expressão da proteína p53 pode ser reprimida por Mdm2 através de três mecanismos distintos. No primeiro, Mdm2 se liga a p53 na seu domínio de transativação e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição. No segundo, promove a exportação nuclear de p53 para o citoplasma. E no terceiro, Mdm2 serve como uma ligase de ubiquitina que promove a degradação de p53 (Michael & Oren, 2002). Dos três mecanismos, destaca-se a ubiquitinação na extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica, exportando a p53 do núcleo para o citoplasma, onde a p53 será degradada pelo proteossoma, justificando a esporádica expressão citoplasmática de p53 pela imunoistoquímica e caracterizando uma forma mais agressiva de tumor (Zhang & Xiong, 2001; Teixeira et al., 2011).

No câncer de bexiga em humanos, o gene Tp53 é um dos mais estudados, mas com diferentes resultados no que diz respeito ao seu uso como um marcador de prognóstico (Baffa et al., 2006). No entanto, estudos prévios mostraram uma correlação entre a expressão do p53 e a progressão dos tumores de bexiga (Sarkis et al., 1993; Serth et al. 1995). Neto et al. (2002) estudaram a correlação da expressão da p53 e as características histopatológicas do câncer de bexiga e concluíram que a p53 pode prever o grau tumoral, estágio e incidência de metástases. Esses resultados foram confirmados por Dias Neto et al. (2002) que descrevem também a boa correlação entre a positividade do p53 com a progressão da doença caracterizada pela menor sobrevida. Isto ocorreu inclusive para os tumores não-músculo invasivos pTa e pT1 no momento do diagnóstico. Estes dados permitem questionar o tratamento conservador (ressecção transuretral) de tumores

superficiais em que o p53 é positivo (Dias Neto et al., 2002) e demonstram, também, a importância deste marcador para o CB, possibilitando identificar pacientes que podem se beneficiar de tratamentos adicionais e uma vigilância mais próxima após a cistectomia. Ainda, Goebell et al. (2010) indicaram que a acumulação da proteína p53 mutada está associada com um comportamento tumoral mais agressivo do CB.

Diante deste cenário, é possível afirmar que a acumulação da p53 constitui um fator de prognóstico no CB, estando relacionada com a progressão da doença, e com menores taxas de sobrevivência em humanos (Esrig et al., 1994; Smith et al., 2003; Chatterjee et al., 2004; Mitra et al., 2009).

A proteína p21

O dano ao DNA desencadeia rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da fosforilação da proteína. Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a super expressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA.

A maioria dos mecanismos moleculares para bloquear a progressão do ciclo celular nos pontos de controle são pouco entendidos, em alguns casos, específicas proteínas inibidoras Cdk entram em jogo; estas bloqueiam a ação ou atividade de uma ou mais complexos ciclinas-cdk. No início do ciclo mitótico, o gene p53 ativa transcricionalmente o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA. Quando p21 está conjugada à PCN (*proliferating cell nuclear antigen*), a proteína p53 irá promover o reparo no DNA. Pode ocorrer também a mutação do gene Tp53, que codifica a proteína p53, e nesses casos ocorre a formação de proteínas não funcionais, que podem conferir às células tumorais condições para sobreviverem e se replicarem (Huang et al., 2018).

A proteína p21 é uma das principais proteínas inibidoras do ponto de verificação G1/S, e sua regulação negativa pode levar ao desenvolvimento de vários tipos de tumores, pois é uma reguladora chave do ciclo celular (Tak et al., 2019).

Segundo Nakatani et al. (2001), a p21 desempenha o papel fundamental de parar o ciclo celular, além de ser uma importante proteína no controle da senescência celular, apoptose e desta forma da carcinogênese (Coqueret, 2003).

A p21 foi considerada por Shalitin et al. em 1994 como um importante marcador da monitoração dos resultados do tratamento de pacientes com vários tumores malignos, pois seu alto conteúdo foi associado a menores diferenciações de tecidos em tumores, tais como, linfomas malignos, tumores urogenital e gastrointestinal (Ullmannova et. al.,2003). Desta forma, a relação da proteína p21 com os tratamentos anti-câncer tem sido recentemente mais explorada.

Em um estudo recente, realizado com biópsias de tumores vesicais após a cistoscopia, Al Chalabi et al. (2019) demonstraram que a expressão do antígeno p21 fornece informações prognósticas importantes em pacientes com CB, uma vez que pacientes com tumores que mantiveram a expressão de p21 apresentaram uma taxa estatisticamente diminuída de recorrência do tumor e sobrevida global aumentada, comparado àqueles cujos tumores perderam a expressão da proteína (Al Chalabi et al., 2019).

A via PI3K/AKT/mTOR

A via PI3K/AKT /mTOR é uma importante via de sinalização envolvida no crescimento e invasão celular. Mutações nesta via tem sido associadas com o processo carcinogênico de diferentes tipos de neoplasias, uma vez que as proteínas Pi3K, AKT e mTOR possuem expressões aumentadas em ambientes tumorais, promovendo a proliferação das células. Esta via de sinalização integra sinais de diferentes origens, como fatores de crescimento, hormonais, nutrientes, níveis de oxigênio, além de estar associada à outras vias (Gust e So, 2009).

Esta via é iniciada pela enzima PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), que é ativada por receptores tirosina-quinases ou por receptores acoplados à proteína G (Steck et al., 1997; Puzio-Kuter et al., 2009). A PI3K é um heterodímero que consiste em uma subunidade catalisadora (p110) e uma subunidade reguladora (p85, p55, p50). A subunidade catalítica p110 ativada, codificada pelo gene PI3KCA, fosforila fosfatidilinositol bifosfato 4-5 no folheto interno da membrana citoplasmática onde PI3K converte fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em

fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Gust & So, 2009; Ching & Hansel, 2010) que, por sua vez, se liga à proteína quinase B (AKT 1) e recruta PDK1 (proteína quinase dependente 1) para a membrana celular onde se liga e fosforila o AKT1 (Chen et al., 2009). Este é considerado o nó de sinalização mais crítico nesta via regulando diversos substratos, que afetam processos envolvidos no controle do crescimento e sobrevivência celular (Nawroth et al., 2011).

AKT faz parte de uma grande família de proteínas quinases B (PKB). Sua ativação é um processo de múltiplos passos que envolve seu deslocamento para a membrana e subsequente fosforilação. A família de AKT quinases é o principal alvo de receptores de fator de crescimento tirosina-quinase que utilizam a via de sinalização PI3K (Dubska et al., 2005). Se houver algum tipo de mutação ou ativação anormal dessa via, há uma proliferação descontrolada de células favorecendo o desenvolvimento de neoplasias (Pinzón et al., 2010), uma vez que a ativação de AKT resulta em eventos anti-apoptóticos e indutores da proliferação celular, os quais favorecem a carcinogênese (Cully et al., 2006). Além disso, a ativação de AKT pode contribuir para a metástase tumoral por estimular a secreção de metaloproteínas de matriz (Thant et al., 2000). Ainda, as proteínas PI3K e AKT podem modelar o metabolismo das células através de proteínas que atuam como sensores metabólicos, como o mTOR.

O mTOR é uma proteína quinase que contribui para a regulação, crescimento, metabolismo, sobrevivência e proliferação celular (Saxton & Sabatini, 2017). Foi uma das vias de sinalização molecular clinicamente mais importantes que surgiu ao longo da década passada (Samant et al., 2011), envolvendo um complexo proteico ao qual pertence a PI3K e pelo qual interage com uma série de proteínas formando dois complexos distintos: mTORC1 e mTORC2 (Laplante et al., 2012).

Quando o AKT1 é ativado, inativa o complexo esclerose tuberosa (TSC), composto por TSC1 e TSC2, por fosforilação direta da proteína GTPase ativadora TSC2. TSC2 e TSC1 normalmente atuam como proteínas supressoras tumorais inibindo o crescimento celular, uma vez que regulam negativamente a proteína GTPase ativando a Rheb (homóloga da proteína RAS enriquecida no cérebro). Uma vez libertado da inibição TSC, o Rheb ativa o mTORC1 (Ching e Hansel, 2010). Os aminoácidos ativam mTORC1 por uma via independente mediada pela família de

proteínas Rag (Efeyan e Sabatini, 2010). A GTPases Rag interage com mTORC1, o que promove a sua translocação desde o citoplasma para as membranas lisossomais, local onde possivelmente se encontra Rheb (Laplante e Sabatini, 2012). A ativação do mTORC2 não está bem esclarecida, mas este complexo ativa diretamente AKT por fosforilação (Efeyan e Sabatini, 2010).

O mTOR ativado, subsequentemente, fosforila a proteína p70 S6 cinase-1 (S6K p70) e 4E-BP. A primeira fosforila a proteína ribossômica S6 da subunidade 40S, aumentando a tradução do RNAm, por outro lado, também se liga às membranas mitocondriais inativando a molécula pró-apoptótica BAD. A fosforilação de 4E-BP dá início ao processo de tradução com a consequente formação de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular após a fase G1, tal como a ciclina D1 (Ching e Hansel, 2010).

A proteína mTOR também está relacionada à vias oncogênicas como a via das proteínas RAS e os supressores de tumor, como a p53, citada anteriormente, que é um regulador negativo de mTOR, deste modo, a sinalização de mTOR aumenta em ambientes tumorais (Saxton & Sabatini, 2017). A superativação da via mTOR promove o comportamento mais agressivo da doença em vários tipos de câncer e sua atividade do mTOR foi associada com a redução da sobrevida dos pacientes com CB e aumento na progressão tumoral (Ching e Hansel, 2010).

A proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) também regula a via PI3K/AKT, impedindo a ativação de AKT. Se PTEN está desativado, AKT permanece ativo, anulando o processo de apoptose, favorecendo o aparecimento de células tumorais (Costa, 2012). PTEN atua como supressor tumoral ao desfosforilar a posição 3 de fosfatidilinosítídeos, tal como ocorre com PIP3, onde a desfosforilação ocorre na posição 3 de inositol, produzindo PIP2 (Steck et al., 1997; Oki et al., 2005; Puzio-Kuter et al., 2009). PIP3, localizado na membrana nuclear, promove a sobrevivência celular por inibir a fosfoproteína nucleolar B23, o que sugere que PTEN, tanto no núcleo como no citoplasma, pode atuar como um regulador chave para a sobrevivência celular (Ji-Hyun & Charis, 2005). No citoplasma, PTEN usa a sua atividade de fosfatase lipídica para regular os processos de sinalização celular através da via PI3K/AKT/mTOR, em contraste, no núcleo a PTEN regula o ciclo celular

e a sua progressão mantendo a estabilidade cromossômica independentemente do AKT (Ching e Hansel, 2010; Knowles et al., 2009).

Por meio da desfosforilação de PIP3, PTEN antagoniza as atividades de PI3K e AKT, que podem atuar como oncogenes por promoverem a sobrevivência celular (Kohn & Pommier, 2005). Ao evitar a fosforilação de AKT, PTEN parece não somente controlar a fosforilação de Mdm2 patrocinada por AKT, como também é capaz de regular negativamente a transcrição de Mdm2 (Bettendorf et al., 2004). Evidências sugerem que o controle de PTEN na via AKT desempenha um importante papel na modulação da degradação de p53 dependente de Mdm2 (Freeman et al., 2003; Kohn & Pommier, 2005). A proteína PTEN se liga estruturalmente a p53 no núcleo através de p300/CBP (duas proteínas co-ativadoras da transcrição) formando um complexo PTEN-p300-p53. A formação deste complexo resulta em aumento da atividade transcricional de p53 (Freeman et al., 2003; Kohn & Pommier, 2005; Oki et al., 2005). O complexo p53-PTEN acentua a atividade transcricional de p53 junto ao DNA e induz a transcrição do gene PTEN, elevando os níveis desta proteína. Assim, PTEN exerce importante função na regulação da atividade de p53, uma vez que a ausência de PTEN funcional resulta na perda da atividade de p53 e na incapacidade das células neoplásicas em responder a danos em seu DNA através da indução de reparo ou apoptose (Freeman et al., 2003; Kohn & Pommier, 2005; Oki et al., 2005).

A via PI3K/AKT/mTOR é frequentemente ativada em muitas neoplasias e o descontrole na sua sinalização reflete num mau prognóstico no câncer de pulmão, colo do útero, ovário e esôfago. No CB, foi relatado que esta via pode regular a invasão do tumor, portanto há hipótese de que variações genéticas nesta via podem afetar a sobrevivência dos pacientes (Chen et al., 2010).

A desregulação desta via tem sido bastante implicada no desenvolvimento de carcinoma urotelial (Sun et al., 2011). Diversas alterações moleculares dos efetores da via PI3K/AKT/mTOR foram relatadas no CB, incluindo deleções da PTEN (24-58% de CB músculo invasivo T2-T3-T4), mutações inativadoras do TSC1 (10-15% dos CB), mutações ativadoras de PI3KCA, o gene que codifica a subunidade catalítica de PI3K (20% tumores baixo grau) e AKT (4,8% de CB). Ainda, estudos imunohistoquímicos relataram uma diminuição na expressão de PTEN em cerca de

50% do CB, e um aumento na expressão da pAKT em cerca de 88% dos casos (Claderaro et al., 2014).

Além disso, a atividade do mTOR foi associada com a redução da sobrevivência dos pacientes com CB e aumento do estágio de progressão tumoral (Ching e Hansel, 2010). Em 2011, Sun e colaboradores verificaram que no conjunto de pacientes com mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência, a longo prazo, um pequeno subconjunto com uma taxa de sobrevivência ainda pior, mostrou uma expressão elevada de p-mTOR e pAKT, indicando que o mTOR ativo e a AKT promovem a doença mais agressiva (Sun et al., 2011). Esta conclusão é corroborada pelo estudo de Hansel e colaboradores que demonstraram, que o p-mTOR ativo reduz a sobrevivência em pacientes com CB músculo-invasivo (Hansel et al., 2010).

Os Oncogenes RAS

A família de oncogenes RAS é composta por três diferentes proteínas (N-RAS, K-RAS e H-RAS), sendo que essas proteínas apresentam um envolvimento direto no desenvolvimento de 30% dos cânceres humanos (Van der Weyden e Adams, 2007). O N-RAS está ativo em tumores hematopoiéticos (leucemias, linfoma de Burkitt, neuroblastoma, sarcomas, carcinoma do cólon) ao passo que os H-RAS e K-RAS estão ativos em tumores humanos (câncer de bexiga, pulmão, cólon, pâncreas, sarcomas, tumores hematopoiéticos, neuroblastomas) e de animais (neuroblastomas do rato, cancro da bexiga do murganho) (Manso, 1985).

A importância das proteína RAS na sinalização intracelular foi elucidada por meio de experimentos com microinjeção de RAS ativa e anticorpos anti-RAS, mostrando que RAS não é somente capaz de induzir o crescimento anormal característico de células de câncer, mas é necessária para a resposta de células normais à estimulação por fatores de crescimento (Lunke et al., 2017, Varga et al., 2017).

Os oncogenes RAS atuam regulando e controlando diversas funções celulares como a proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose, em resposta a sinais extracelulares. Desempenham o papel de ativadores de sinalização quando se ligam a guanosina trifosfato (RAS-GTP), ou desativadores de sinalização quando se

ligam a guanosina difosfato (RAS-GDP). Sob condições normais, células quiescentes possuem menos de 5% de sua concentração de RAS no estado ativo, contra quase 50% sob estimulação mitogênica (ADJEI, 2001). Sua atividade é regulada por meio da interconversão entre os estados ativo e inativo, e realizada por duas classes distintas de proteínas: os fatores de troca de nucleotídeos guanina (*guanine nucleotide exchange factors* – GEFs) e as proteínas ativadoras de GTPase (*GTPase activating proteins* – GAPs) (Alberts et al., 2004). Os GEFs estimulam a dissociação do GDP e a ligação ao GTP do citosol, resultando na formação do estado GTP-ligante ativo. Diferentemente, os GAPs reconhecem a forma GTP-ligante e direcionam a atividade intrínseca de GTPase de RAS, e isso aumenta a velocidade de hidrólise do GTP, e a inativa pela formação da proteína GDP-ligante (Rebollo e Martínez, 1999; Duursma & Agami, 2003; Alberts et al., 2004).

Uma vez ativada, RAS ativa várias outras proteínas sinalizadoras, e isso resulta na transdução de sinais em diferentes vias, como por exemplo a cascata de fosforilação serina/treonina, que envolve a via MAPK (Alberts et al., 2004), que quando estimula a proliferação celular e inibe a ocorrência de apoptose (Ahlquist et al., 2008), e a síntese da proteína p21 que desempenha um importante papel no controle do ciclo celular (Manso, 1985). As mutações nos genes que codificam as proteínas RAS causam entre 20 a 30% de todos os tumores malignos, uma vez que as ligações RAS-GTP são hiperativas e estimulam as células tumorais a se dividirem continuamente (Varmus, 2006). Alterações nestes genes podem afetar adversamente a proliferação celular e aumentar a suscetibilidade de desenvolvimento do câncer.

Em 1982, Der et al. descobriram que o gene HRAS, um dos primeiros oncogenes humanos descritos, também estava associado ao CB sendo identificado na linhagem celular T24 (células de tumor de bexiga humana). Nos carcinomas uroteliais, os oncogenes RAS parecem promover a transformação de tumores benignos em fenótipos malignos através da superexpressão de receptores de fator de crescimento epitelial (EGFR) (Przybojewska et. al., 2000).

Przybojewska et al. (2000) mostraram que H-RAS encontra-se ativo em 84% dos espécimes de CBMI, porém a relação entre as alterações em KRAS com o câncer

urotelial ainda é pouco explorada. No entanto, devido ao alto grau de homologia (>90%) entre as isoformas de RAS, assume-se habitualmente que elas são funcionalmente redundantes (Prior & Hancock, 2001). A proteína KRAS apresenta importante papel na regulação celular, participando de vários eventos, entre eles a proliferação celular. Esta proteína pode sofrer uma mutação oncogênica e devido a isso, estimular a célula a realizar proliferações sem controle. No CB há hipóteses de que esta proteína possa agir através da ativação da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) ou das vias AKT/STAT (Jebar et al., 2005).

Mo et al. (2007) estudaram H-RAS e o comportamento dos tumores vesicais não invasivos e demonstraram uma relação entre o oncogene, o grau e a agressividade tumoral. Os autores concluíram que a superativação de H-RAS por mutação puntiforme e superexpressão, é necessária e suficiente para induzir tumores vesicais não invasivos e que a inibição dessa atividade poderia ser uma alternativa terapêutica.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) representa 70% dos carcinomas uroteliais e embora tenham uma sobrevivência prolongada, os pacientes que sofrem desta doença apresentam altas taxas de recorrência tumoral. O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral, seguido da imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), no entanto os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias ou associações antitumorais para o tratamento do CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos do que as terapias clássicas, são muito relevantes. Nesta linha, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas, que possam ser usadas isoladas ou associadas à outras modalidades terapêuticas, para o tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o CBNMI.

Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como modificadores de resposta biológica, nosso laboratório em parceria com o NANOBIOS (Instituto de Química – UNICAMP), desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado OncoTherad (ou MRB-CFI-1: Modificador de Resposta Biológica - Complexo Fosfato Inorgânico 1). Os resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o OncoTherad foi capaz de impedir a progressão tumoral na bexiga urinária dos animais induzidos quimicamente ao CBNMI, e também demonstrou baixa taxa de mortalidade (zero) e ganho de peso corporal dos animais após o início do tratamento.

Assim, a imunoterapia com OncoTherad, isolada ou associada à agentes quimioterápicos, como a Cisplatina, por exemplo, pode constituir uma promissora alternativa terapêutica na falha ou recidiva do BCG para o CBNMI. Outro ponto relevante é o estudo da interação das diferentes modalidades terapêuticas com os mecanismos de proliferação celular, resistência à ação de fármacos e progressão tumoral, envolvendo as vias de sinalização de proteínas específicas, como p53, p21, HRAS-KRAS, PTEN, PI3K, AKT e mTOR, as quais são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial.

Considerando a importância de tratamentos alternativos que reduzam as taxas de recorrência, progressão tumoral, bem como seu impacto na evolução clínica dos pacientes com CBNMI, os objetivos gerais deste estudo serão caracterizar a inibição da progressão tumoral e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares das estratégias terapêuticas utilizando OncoTherad e Cisplatina no tratamento do CBNMI induzido em ratos, bem como estabelecer a interação destas estratégias terapêuticas com os principais marcadores prognósticos para este tipo de carcinoma. Ainda, o presente projeto objetiva responder questões importantes acerca dessa promissora estratégia terapêutica, como a taxa de mortalidade e os mecanismos de ação destes fármacos. Tais objetivos gerais serão alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterizar os efeitos histopatológicos de ratos induzidos quimicamente ao CBNMI e comparar a inibição da progressão tumoral frente às estratégias terapêuticas utilizando OncoTherad e Cisplatina.
- b) Caracterizar os efeitos histopatológicos e comparar a inibição da progressão tumoral das diferentes estratégias terapêuticas na sobrevida - 30, 90 e 180 dias após o tratamento - de ratos induzidos quimicamente ao CBNMI.
- c) Analisar e comparar a sobrevida dos animais submetidos às diferentes estratégias terapêuticas, considerando fatores que refletem a qualidade de vida do animal doente, tais como ganho/perda de peso corporal, variações no consumo de água e ração, outras alterações no trato urinário (presença de cálculos vesicais/renais e hidroureter), a inibição da progressão tumoral e o tempo de vida dos animais.
- d) Caracterizar e comparar os efeitos moleculares das estratégias terapêuticas utilizando OncoTherad, Cisplatina, e a combinação destes fármacos, através das análises imunohistoquímicas de importantes marcadores prognósticos do CB (p53, P21, HRAS-KRAS, PTEN, PI3K, AKT e mTOR) na bexiga urinária de ratos induzidos quimicamente ao CBNMI.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais e Procedimento Experimental para a Indução do CBNMI

No presente projeto foram utilizadas 115 ratas da variedade Fischer 344, na faixa etária de dez semanas, pesando em média 180 - 190 gramas, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). O estudo foi realizado em duas etapas, a primeira com 27 animais (Grupos: controle sadio,

animais induzidos quimicamente ao CBNMI sem tratamento e grupos tratados com OncoTherad ou Cisplatina após a indução do CBNMI) e a segunda etapa com 88 animais submetidos à períodos experimentais mais longos (sobrevida) pós-tratamento com OncoTherad e/ou Cisplatina.

Para a indução do CBNMI, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Ketamina 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 citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando quatro doses (Fávaro et al., 2012). Os animais considerados como Grupo Controle não receberam doses de MNU. Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram submetidos ao exame de ultrassonografia para confirmar a presença de tumor na bexiga urinária e, posteriormente foram divididos ramdomicamente em cinco grupos: **Grupo Controle:** não induzido ao CBNMI, sem tratamento; **Grupo MNU (Câncer):** induzido ao CBNMI, sem tratamento; **Grupo OncoTherad IP:** recebeu uma dose intraperitoneal de 10 mg/Kg de OncoTherad dissolvida em 0,2 ml de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas; **Grupo OncoTherad IV:** recebeu uma dose intravesical de 10 mg/Kg de OncoTherad dissolvida em 0,2 ml de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas; **Grupo Cisplatina:** recebeu uma dose intraperitoneal de 0,25 mg/Kg de Cisplatina uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas (Kong et al., 2007). As doses intravesicais (Grupo OncoTherad IV) foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (Abocath, São Paulo, Brasil).

Na primeira etapa deste estudo, os animais tratados com OncoTherad ou Cisplatina foram eutanasiados sete dias após a última dose do tratamento e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas. A **Figura 1** ilustra o esquema de tratamento dos grupos experimentais.

Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida ad libitum (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal e foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) – UNICAMP (protocolo número: 4324-1/2015).

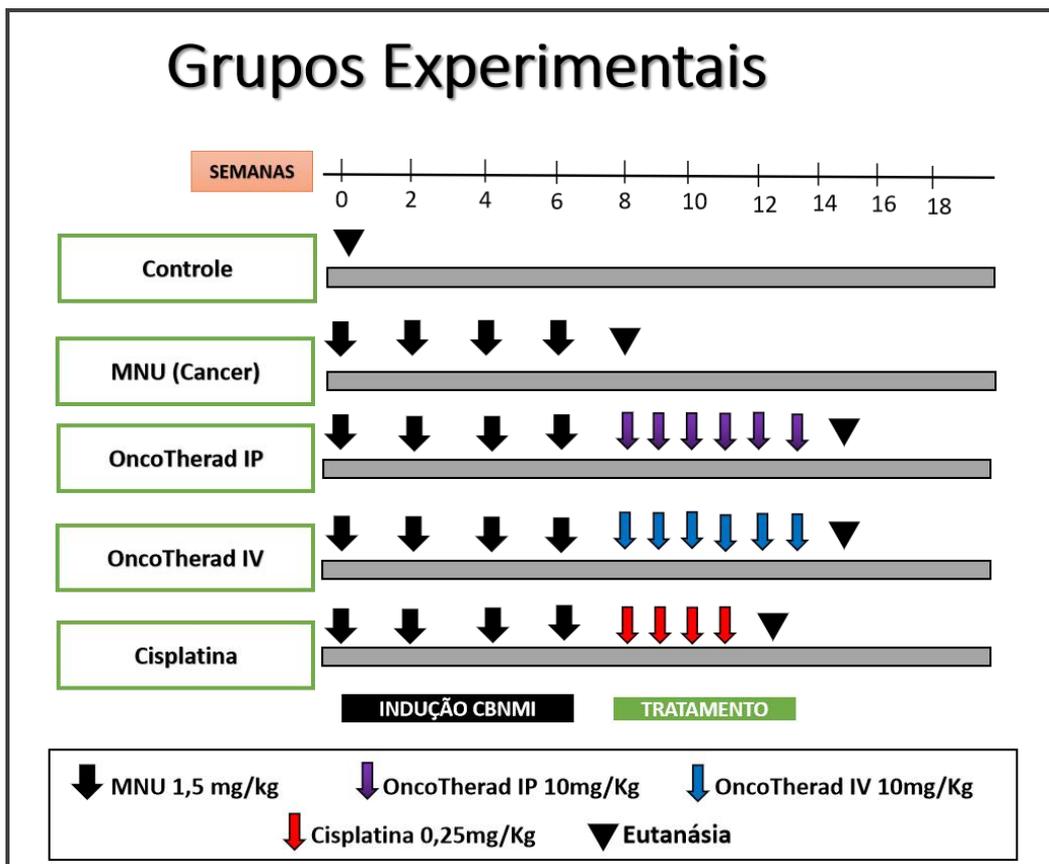


Figura 1. Esquema de Tratamento dos diferentes grupos experimentais. (IP: tratamento via intraperitoneal e IV: tratamento via intravesical).

3.2 - Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral

Para a análise da sobrevida e regressão/progressão tumoral pós-tratamento, o protocolo experimental foi realizado novamente em outros 88 animais, seguindo o mesmo modelo dos grupos experimentais apresentados na **Figura 1**. Neste teste adicionamos um novo grupo que recebeu o tratamento simultâneo de Cisplatina e OncoTherad IV (no mesmo esquema de tratamento realizado com os fármacos isolados). Os tempos de sobrevida foram de 30, 90 e 180 dias após o final do tratamento, para todos os grupos experimentais. Nestes dois últimos casos, os animais receberam doses de manutenção mensal do tratamento já realizado no início. Após a indução do CBNMI os animais foram submetidos ao exame de

ultrassonografia para confirmar a presença de tumor na bexiga urinária. Os períodos experimentais do teste de sobrevivência terão a seguinte nomenclatura: **SV30** (grupos experimentais eutanasiados 30 dias após o término do tratamento), **SV90** (grupos experimentais eutanasiados 90 dias após o término do tratamento) e **SV180** (grupos experimentais eutanasiados 180 dias após o término do tratamento).

Os animais foram mantidos nas mesmas sob as mesmas condições de dieta e temperatura e, após o tempo de sobrevivência, foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas. O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal (CEUA/UNICAMP: 4324-1/2015).

3.3- Análises Histopatológicas

Para as análises histopatológicas, amostras da bexiga urinária dos animais de cada grupo experimental foram coletadas e fixadas em Bouin por 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera Nikon DS-R1-1 (Nikon, Tóquio, Japão). O diagnóstico das lesões uroteliais foram classificadas conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein et al., 1998).

3.4- Imunomarcção dos Antígenos: p53, p21, HRAS-KRAS, PTEN, PI3K, AKT e mTOR

Amostras da bexiga urinária dos animais de cada grupo experimental (n=7), as mesmas utilizadas para as análises histopatológicas, foram utilizadas para as

imunomarcações. A seguir foram obtidos cortes com 5µm de espessura no micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas será obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos p53, p21, HRAS-KRAS, PTEN, Pi3K, AKT e mTOR foram localizados através dos anticorpos primários específicos (**Tabela 1**), diluídos em BSA 1% e armazenados overnight a 4 °C. O kit MACH 4 Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, EUA) foi usado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit MACH 4 por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera Nikon DS-RI-1 (Nikon, Tóquio, Japão). Para avaliar a intensidade das imunorreações dos antígenos nas células uroteliais da bexiga urinária foram examinados cinco campos com aumento de 400x para cada anticorpo. Os resultados das imunomarcações foram analisados por porcentagem de imunorreatividade, através da quantificação da intensidade da marcação obtida nas diferentes situações pelo programa de análise de imagens ImageJ. Além da porcentagem de imunorreatividade de cada grupo experimental, classificamos as intensidade da marcação por scores (0 - 4), sendo 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células uroteliais positivas; 1 (muito fraca), 1-25% de células uroteliais positivas; 2 (fraca), 25-50% de células uroteliais positivas; 3 (moderada), 50-75% de células uroteliais positivas; e 4 (intensa) >75% de células uroteliais positivas (Andrade, G. H. B. et al.; Souza, B. R. et al., 2018).

Tabela 1. Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação.

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Código	Fonte
p21	Coelho, policlonal	bs10129r	<i>Bioss, EUA</i>
p53	Mouse, monoclonal	gtx70218	<i>GeneTex, EUA</i>
PI3K	Mouse, monoclonal	sc1637	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
PTEN	Mouse, monoclonal	sc7974	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
mTOR	Coelho, policlonal	20657-ap	Protein Tech, EUA
AKT	Mouse, monoclonal	sc5298	<i>Santa Cruz Biotechnology, EUA</i>
HRAS+KRAS	Coelho, policlonal	bs-6165r	<i>Bioss, EUA</i>

3.5 - Análises Estatísticas

Todos os parâmetros foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos. Os índices de inibição da progressão tumoral (IPT) e taxa de mortalidade foram avaliados por meio do Teste de Qui-Quadrado. Os dados de pesos, consumo de ração e água assim como as quantificações de imunorreatividade foram analisados através da análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey quando apresentaram normalidade (Teste de Shapiro-Wilk). Na ausência de normalidade, foi realizado o teste de variância não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. A significância estatística estabelecida foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

4 – RESULTADOS

• Ultrassonografia dos animais induzidos ao CBNMI

Após a indução do CBNMI, os animais experimentais foram submetidos ao exame de ultrassonografia para confirmar a ocorrência de lesões na bexiga urinária dos mesmos. Os resultados confirmaram a presença de lesão em 100% dos animais induzidos quimicamente com o MNU, mostrando a eficiência deste carcinógeno ao induzir o CBNMI em ratos. Após o exame de ultrassonografia os animais induzidos foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais. As imagens dos exames de ultrassonografia estão ilustrados na **Figura 3**.

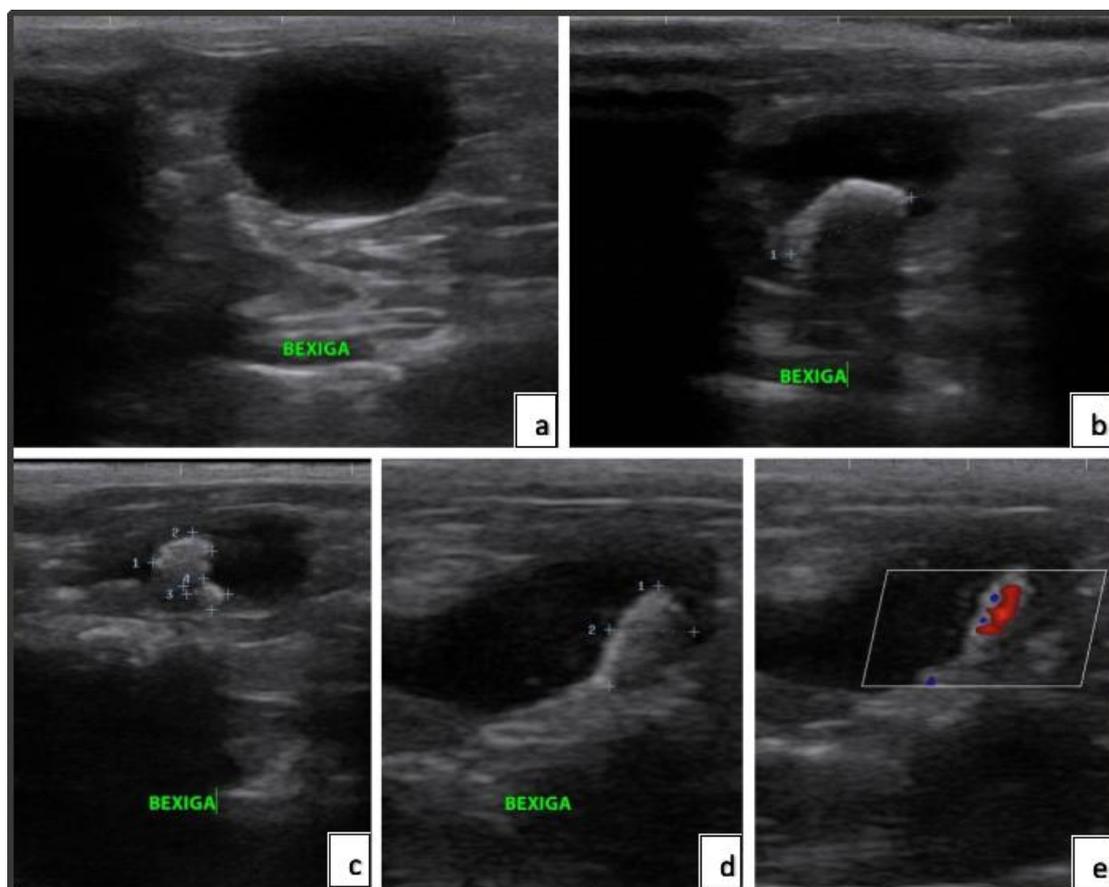


Figura 2. Imagens do exame de ultrassonografia da bexigas urinárias dos grupos experimentais. **(a)** bexiga urinária, antes da indução do CBNMI, sem lesão; **(b,c,d)** bexiga urinária com lesão após indução do CBNMI com MNU (1,5mg/kg); **(e)** Presença de vascularização ao mapeamento Doppler.

4.1 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais Pós-Tratamento com OncoTherad ou Cisplatina

• A Imunoterapia com OncoTherad foi efetiva na Inibição da Progressão Tumoral no tratamento de ratos com CBNMI quimicamente induzido

As análises histopatológicas mostraram que os animais do Grupo Controle não apresentaram alterações estruturais na bexiga urinária, mantendo, desta forma o urotélio composto por 2 - 3 camadas de células, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical (**Figura 3A**). No entanto os animais do Grupo MNU (Câncer) as análises histopatológicas da bexiga urinária evidenciaram a presença de lesões malignas em 100% dos animais, caracterizadas pela presença de carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero (pTa) e carcinoma *in situ* (pTis) em 60%, 20% e 20%, respectivamente, após tratados com apenas com MNU (**Tabela 2**). O carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (**Figuras 2B**) foi caracterizado por células neoplásicas agrupadas em pequenos grupos ou cordões invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos aumentados.

Nos animais tratados com OncoTherad na via intraperitoneal (OncoTherad IP) as análises histopatológicas da bexiga urinária evidenciaram a presença de carcinoma papilífero (pTa) em 66,67% dos animais (**Figura 3D**). Nestes animais foi observado também a presença de hiperplasia papilífera (**Figuras 3C**), uma lesão benigna na frequência de 16,67%. Ainda neste grupo, a ocorrência de lesões pré-malignas esteve presente em 16,67% dos animais, caracterizada pela neoplasia intraurotelial de baixo grau, onde observa-se células com moderada atipia nuclear.

Quando tratados com OncoTherad na via intravesical (OncoTherad IV), os resultados das análises histopatológicas da bexiga urinária confirmaram a presença de lesões malignas como carcinoma papilífero (pTa) em 33,34% e carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (pT1) em 16,67% dos animais (**Figuras 3F**). Lesões benignas foram observadas em 50% dos animais que receberam este

tratamento, sendo que estes apresentaram em seu urotélio apenas uma hiperplasia papilífera (**Figura 3E**), caracterizada pelo espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas.

Nos animais tratados com Cisplatina, as alterações histopatológicas observadas na bexiga urinária dos animais foram o carcinoma *in situ* (pTis) presente em 60% (**Figura 3H**), o carcinoma papilífero (pTa) presente em 20% (**Figura 3G**), e carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) presente em 20% dos animais deste grupo. O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes.

Os resultados das análises histopatológicas estão representados na **Tabela 2** e as fotomicrografias das alterações histológicas mais frequentes em cada grupo são apresentadas na **Figura 3**.

Considerando que a indução do câncer com o MNU é efetiva e resulta em 100% de lesões malignas, neste trabalho as lesões benignas e pré-malignas (ou seja, lesões “não-malignas”) representarão o índice de inibição da progressão tumoral (IPT). Desta forma, podemos afirmar que o tratamento com OncoTherad na via intraperitoneal e intravesical promoveu a inibição da progressão tumoral em 33,34% e 50,00% dos animais experimentais, respectivamente. Ou seja, nestes animais, observamos que a terapia administrada via intravesical associa-se à maior IPT. Sendo que o IPT no grupo OncoTherad IV foi estatisticamente superior aos grupos experimentais MNU e Cisplatina. Contudo, das estratégias testadas, o tratamento com Cisplatina foi o único que não apresentou inibição da progressão tumoral logo após o término do tratamento.

Tabela 2. porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos grupos experimentais Pós-Tratamento*.

Lesões Uroteliais		Controle (n=5)	MNU (n=5)	OncoTherad IP (n=6)	OncoTherad IV (n=6)	Cisplatina (n=5)
Ausência de lesões	Urotélio Normal	100% (5)	–	–	–	–
Lesões Benignas	Hiperplasia Plana	–	–	–	–	–
	Hiperplasia Papilífera	–	–	16,67% (1)	50,00% (3)	–
Lesões Pré Malignas	Metaplasia Escamosa	–	–	–	–	–
	Neoplasia Intraurotelial de baixo grau	–	–	16,67% (1)	–	–
Lesões Malignas	Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	–	20% (1)	–	–	60% (3)
	Carcinoma Papilífero (pTa)	–	20% (1)	66,67% (4)	33,33% (2)	20% (1)
	Carcinoma com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	–	60% (3)	–	16,67% (1)	20% (1)
Inibição da Progressão Tumoral (IPT)			0% a	33,33% ab	50,00% b	0% a

*Animais experimentais eutanasiados 7 dias após o término do tratamento. Grupos: Controle, MNU-Câncer, OncoTherad IP, OncoTherad IV e Cisplatina. (IP: tratamento via e intraperitoneal; IV tratamento via intravesical). IPT: valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

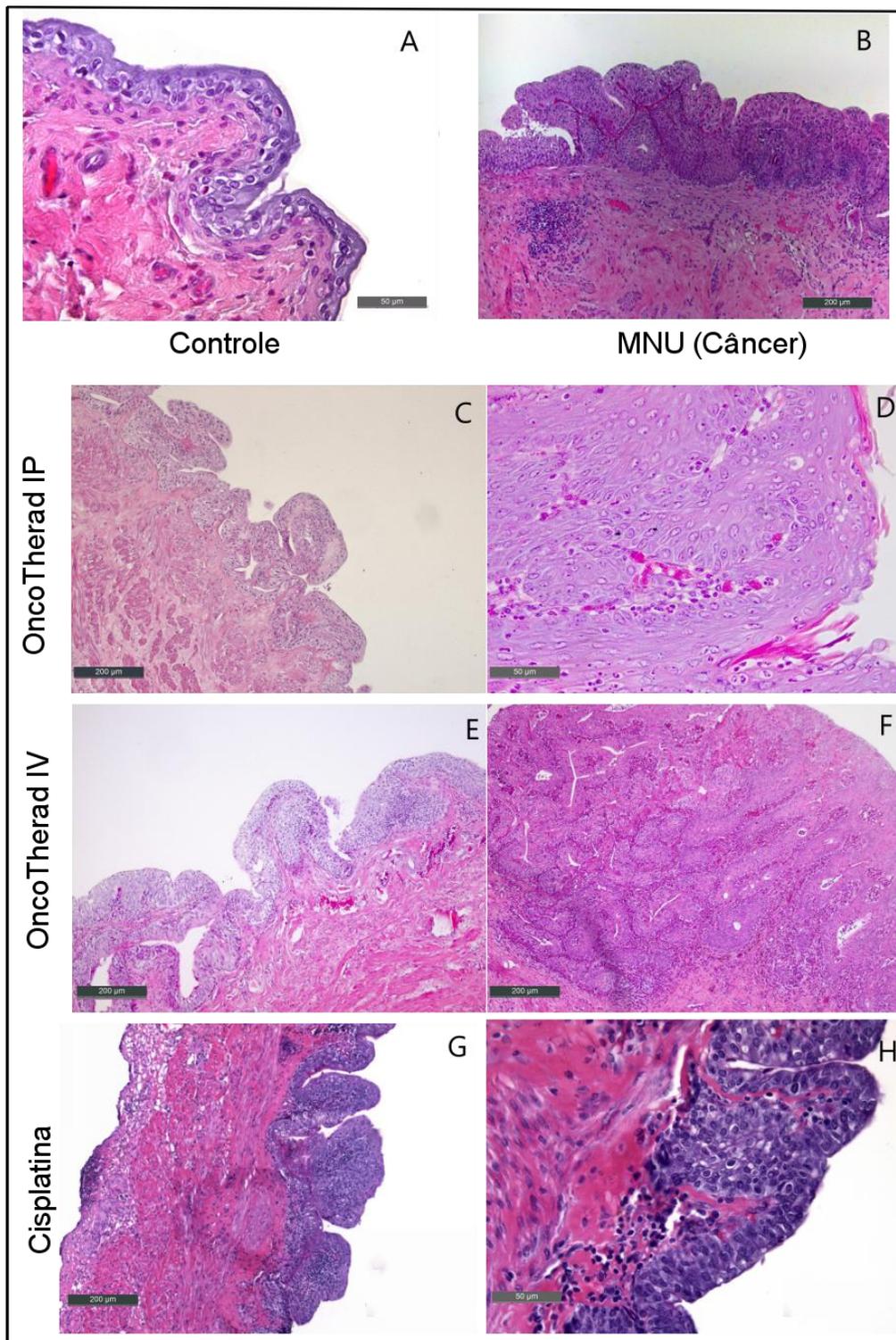


Figura 3. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos experimentais Pós-Tratamento. Grupos: Controle (A), MNU (B), OncoTherad IP (C,D), OncoTherad IV (E,F) e Cisplatina (G,H). (A) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais, uma camada intermédia de células e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva; (B) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos invadindo a lâmina própria; (C) Hiperplasia papilífera, caracterizadas por espessamento do urotélio com ausência de atipias citológicas; (D) carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade; (E) Hiperplasia papilífera; (F) carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria; (G) carcinoma papilífero (pTa) e (H) carcinoma *in situ* (pTis) caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano. Coloração: Hematoxilina de Harris e Eosina alcóolica.

• Análises Macroscópicas do Trato Urinário dos animais experimentais Pós-Tratamento

No momento da eutanásia verificamos a frequência de alterações estruturais no trato urinário dos animais, tais como presença de cálculo vesical, cálculo renal e hidroureter. Os animais do grupo Controle (sadios) não apresentavam alterações estruturais macroscópicas no trato urinário, como se esperava. Nos animais do grupo MNU (Câncer), embora a lesão na bexiga urinária fosse visível macroscopicamente, o trato urinário também não apresentava alterações estruturais significativas, evidenciando que as alterações futuras seriam decorrentes dos efeitos adversos da evolução da carcinogênese e/ou dos tratamentos realizados.

No grupo tratado com Cisplatina, a presença de cálculo vesical foi vista em 20,00% dos animais, e 30,00% dos animais deste grupo apresentaram hidroureter, no entanto não houve formação de cálculo renal nestes animais. Os animais tratados com OncoTherad (via intraperitoneal e via intravesical) não apresentavam cálculo renal, e a presença de hidroureter foi de 33,33% nos animais que receberam esta imunoterapia nas duas vias de administração. No entanto, a presença de cálculo vesical foi maior nos animais tratados via intraperitoneal (50,00%), comparado aos animais tratados com o mesmo fármaco via intravesical (16,66%). A **Tabela 3** mostra a frequência das alterações estruturais do trato urinário destes grupos experimentais eutanasiados após (7 dias) o término do tratamento.

Tabela 3. Análise Macroscópica do trato urinário dos animais experimentais Pós-Tratamento*.

Alterações Estruturais do Trato Urinário	Controle (n=5)	MNU (n=5)	OncoTherad IP (n=6)	OncoTherad IV (n=6)	Cisplatina (n=5)
Cálculo Vesical	Ausente	Ausente	50,00% (3)	16,66% (1)	20,00% (1)
Hidroureter	Ausente	Ausente	33,33% (2)	33,33% (2)	30,00% (3)
Cálculo Renal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

*Animais experimentais eutanasiados 7 dias após o término do tratamento. Grupos: Controle, MNU-Câncer, OncoTherad IP, OncoTherad IV e Cisplatina. (IP: tratamento via intraperitoneal; IV tratamento via intravesical).

4.2 - Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral

4.2.1 - Peso Corporal e Consumo de Água e Ração dos grupos experimentais

Os grupos experimentais destinados ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral, foram acompanhados semanalmente desde o início indução do CBNMI até a eutanásia dos mesmos. Durante este período, analisamos a variação do peso corporal, o ganho de peso/semana também bem como o consumo de água e ração destes animais. Para realizar esta análise, observamos todos os animais tratados com a mesma estratégia terapêutica em conjunto, independente do período de sobrevida (SV30, SV90 e SV180). Desta forma, o n (nº de animais) inicial para este teste foi de 22 animais/grupo, sendo que nas análises dos períodos de sobrevida mais longos o n/grupo foi menor, devido à eutânasia dos animais (SV90) e eventuais mortalidades (SV180). Os resultados desta análise são apresentados na **Tabela 4**.

- **Estratégias terapêuticas baseadas no uso isolado do OncoTherad ou Cisplatina promovem aumento no peso corporal após o tratamento e na sobrevida pós-tratamento**

Nossos resultados demonstraram que em todos os grupos experimentais o peso corporal inicial (antes de se realizar qualquer procedimento experimental) e após a indução química do CBNMI foram estatisticamente semelhantes. Entretanto, após o tratamento observou-se um aumento significativo no peso corporal dos animais tratados com OncoTherad IP comparado àqueles tratados com Cisplatina+OncoTherad.

Nos grupos SV30 (eutanasiados 30 dias após o término do tratamento) também observamos um aumento significativo no peso corporal dos animais tratados com OncoTherad IP, desta vez comparado com àqueles tratados com o mesmo fármaco na via intravesical (OncoTherad IV) e com os que receberam tratamento com Cisplatina+OncoTherad. Ainda, em SV30 observamos que o grupo

tratado apenas com Cisplatina apresentou peso corporal estatisticamente maior do que o grupo tratado com os fármacos em combinação (Cisplatina+OncoTherad).

Os grupos experimentais eutanasiados 90 dias após o término do tratamento (SV90) apresentaram aumento estatisticamente significativo no peso corporal quando foram tratados com OncoTherad IP ou Cisplatina, comparado àqueles tratados com os dois fármacos. Pode-se observar ainda um aumento significativo no peso corporal do grupo Cisplatina, quando comparado ao tratado com OncoTherad IV. Entretanto, no maior período de sobrevivência (SV180) o peso corporal dos quatro grupos experimentais voltaram a ser estatisticamente semelhantes.

Esses resultados (**Tabela 4**) nos permite concluir primeiramente que as quatro estratégias terapêuticas não promovem perda de peso corporal, uma das grandes desvantagens dos tratamentos anticâncer, e, também que a associação das duas estratégias terapêuticas, baseada na imunoterapia e quimioterapia, promovem redução no peso corporal dos animais, quando comparados com aqueles grupos tratados apenas com OncoTherad ou Cisplatina.

- **Os tratamentos administrados via intraperitoneal, seja com OncoTherad IP ou Cisplatina, promovem maior ganho de peso semanal**

Na análise do ganho de peso semanal, primeiramente observamos as diferentes estratégias terapêuticas em cada período experimental (inicial, durante a indução do CBNMI, durante o tratamento e dentro de cada período de sobrevivência). Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais no período inicial, na indução e também nos diferentes períodos de sobrevivência (**Tabela 4**). Entretanto, durante o tratamento os animais do grupo OncoTherad IP apresentavam ganho de peso semanal significativamente maior do que aqueles do grupo Cisplatina+OncoTherad, confirmando os dados de peso corporal pós tratamento mencionados anteriormente.

Neste estudo realizamos ainda uma análise durante todo o período experimental, considerando a média de ganho de peso/semana nos diferentes grupos experimentais. Nesta análise observamos um aumento significativo naqueles

animais tratados com os fármacos na via intraperitoneal, seja com OncoTherad IP ou com Cisplatina. Adicionalmente pudemos observar um aumento no ganho de peso semanal no grupo OncoTherad IV, comparado àqueles tratados com Cisplatina+OncoTherad. O gráfico da variação de peso corporal dos animais durante todo o período experimental está ilustrado na **Figura 4**.

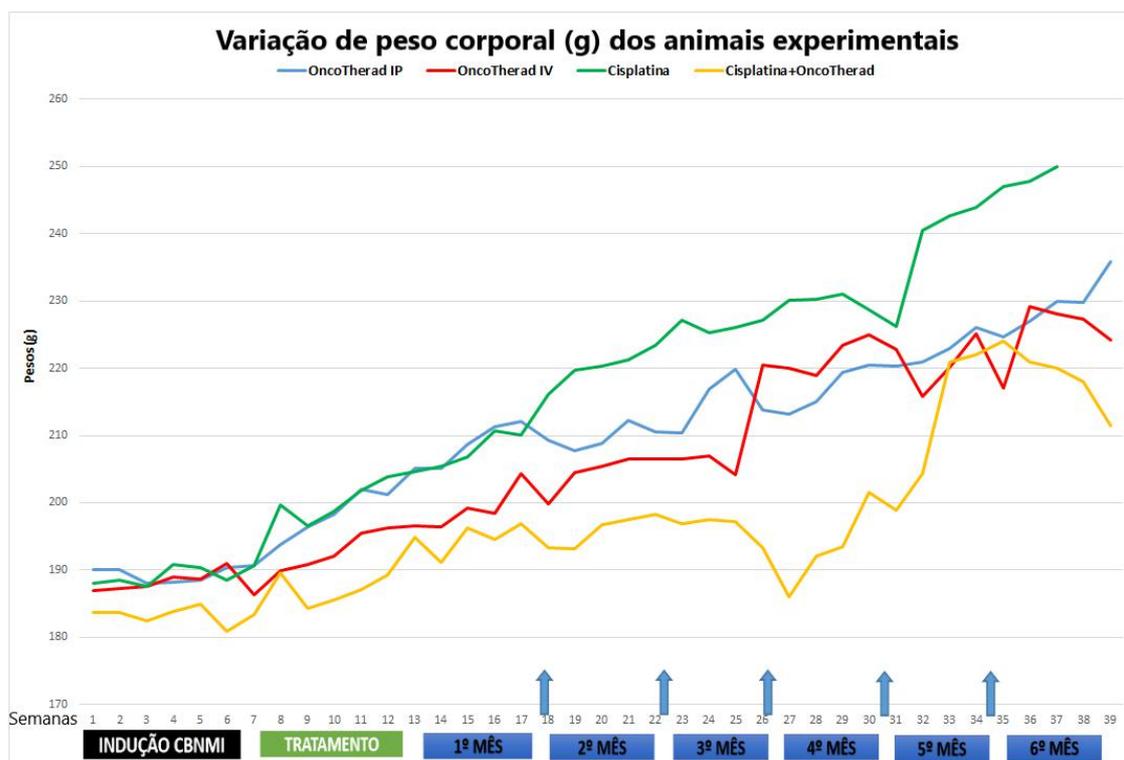


Figura 4. Gráfico da variação de peso corporal (g) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos durante todo o período experimental. Setas azuis indicam as doses de manutenção realizadas mensalmente.

- **O tratamento intravesical com OncoTherad, isolado ou associado à Cisplatina, promove aumento significativo no consumo de água**

O consumo de água semanal nos diferentes grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes inicialmente, durante a indução e no período de tratamento. Um aumento significativo no consumo de água foi visto nos animais tratados com o OncoTherad IV e também quando este fármaco foi associado ao quimioterápico (Cisplatina+OncoTherad) nos períodos de sobrevivência SV30 e SV90.

Ainda, em SV90 observou-se que o consumo de água no grupo Cisplatina+OncoTherad foi estatisticamente maior do que naqueles tratados apenas com OncoTherad IV. Entretanto no maior período de sobrevida (SV180) o consumo de água dos grupos experimentais voltaram a ser estatisticamente semelhantes **(Tabela 4)**.

- **O consumo semanal de ração é aumentado no grupo Cisplatina nos maiores períodos experimentais (SV90 e SV180)**

Na análise do consumo semanal de ração observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais inicialmente, durante a indução, no período de tratamento e em SV30 **(Tabela 4)**. No entanto, em SV90 pudemos observar um aumento significativo no consumo semanal de ração no grupo Cisplatina, comparado aos demais grupos, e em SV180 o consumo no grupo Cisplatina ainda foi estatisticamente maior do que no grupo tratado com Cisplatina+OncoTherad.

Tabela 4. Dados de peso corporal (g), consumo semanal de ração (g) e consumo de água (ml) por animal dos grupos experimentais nos diferentes períodos e tratamentos.

Parâmetros		Grupos Experimentais (n inicial=22/grupo)*			
		Oncotherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina+OncoTherad
Peso Corporal (g)	Inicial*	190,0 ± 10,3 a	187,3 ± 6,1 a	188,5 ± 6,2 a	183,7 ± 6,7 a
	Após Indução*	193,8 ± 12,5 a	189,9 ± 12,7 a	196,0 ± 7,4 a	189,6 ± 9,9 a
	Após Tratamento*	205,1 ± 9,5 a	196,5 ± 9,5 ab	203,3 ± 8,1 ab	193,5 ± 11,5 b
	SV30	212,2 ± 8,9 a	202,3 ± 11,1 bc	206,1 ± 16,4 ab	198,0 ± 10,4 c
	SV90*	219,8 ± 14,3 ac	204,3 ± 17,7 ab	229,3 ± 7,6 c	197,2 ± 16,0 b
	SV180	235,9 ± 16,7 a	224,17 ± 21,2 a	250,0 ± 28,9 a	211,5 ± 19,1 a
Ganho de Peso Semanal (g)	Inicial*	3,0 ± 1,2 a	4,0 ± 1,2 a	2,0 ± 1,9 a	2,6 ± 2,1 a
	Indução*	0,49 ± 1,1 a	0,37 ± 1,4 a	1,07 ± 0,6 a	0,80 ± 1,0 a
	Tratamento*	1,88 ± 1,0 a	1,08 ± 1,4 ab	1,83 ± 0,9 ab	0,65 ± 1,1 b
	SV30	1,77 ± 0,9 a	1,48 ± 0,9 a	0,71 ± 2,4 a	1,12 ± 1,43 a
	SV90*	1,44 ± 0,6 a	0,83 ± 1,3 a	2,08 ± 1,1 a	0,78 ± 0,8 a
	SV180	1,44 ± 0,2 a	1,23 ± 1,0 a	1,73 ± 1,1 a	1,06 ± 0,9 a
	Geral	1,33 ± 0,5 a	0,84 ± 0,5 b	1,46 ± 0,8 a	0,35 ± 0,5 c
Consumo de água/semana (mL)	Inicial	128,2 ± 6,7 a	117,9 ± 15,6 a	129,2 ± 1,9 a	117,6 ± 18,3 a
	Indução	129,1 ± 9,4 a	121,8 ± 14,0 a	127,8 ± 8,4 a	120,8 ± 17,1 a
	Tratamento	126,4 ± 16,7 a	139,4 ± 29,0 a	127,9 ± 9,1 a	150,2 ± 31,5 a
	SV30	120,8 ± 13,0 a	150,7 ± 18,2 b	123,7 ± 12,5 a	164,5 ± 32,9 b
	SV90*	114,6 ± 13,8 a	149,3 ± 8,2 b	117,7 ± 8,9 a	166,0 ± 11,8 c
	SV180	134,6 ± 14,7 a	155,2 ± 29,1 a	129,1 ± 14,6 a	155,7 ± 33,2 a
Consumo de ração/semana (g)	Inicial	79,2 ± 2,5 a	77,4 ± 5,0 a	76,8 ± 3,1 a	72,5 ± 10,9 a
	Indução	74,6 ± 8,7 a	71,7 ± 7,8 a	72,6 ± 7,3 a	68,0 ± 9,9 a
	Tratamento	76,2 ± 5,0 a	72,5 ± 7,4 a	74,3 ± 15,8 a	69,3 ± 10,0 a
	SV30	78,5 ± 4,9 a	75,3 ± 5,8 a	74,9 ± 3,1 a	76,5 ± 8,3 a
	SV90	74,8 ± 6,6 a	75,2 ± 6,5 a	80,7 ± 6,9 b	73,5 ± 4,5 a
	SV180	79,6 ± 11,1 ab	80,7 ± 9,3 ab	86,5 ± 10,4 a	74,5 ± 8,3 b

Valores expressos em média ± desvio padrão. *Análise de Variância ANOVA, Teste de Tukey. Demais parâmetros: ANOVA de Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. *N inicial variável nos períodos sobrevida devido à eutanásia dos animais e ocorrência de eventual mortalidade. Na mesma linha, valores seguidos por letras iguais indicam que não diferem estatisticamente entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2.2 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV30

- **OncoTherad promove IPT estatisticamente significativo na sobrevida pós-tratamento (SV30)**

Os resultados das análises histopatológicas da bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral e eutanasiados 1 mês após o final do tratamento (SV30) mostraram-se diferentes daqueles observados nos animais eutanasiados logo após o final do tratamento, descritos anteriormente.

Nos animais do grupo OncoTherad IP observamos a ocorrência de urotélio normal (caracterizando ausência de lesão) em 28,57% dos animais (**Figuras 5a e 5b**). Lesões benígnas estiveram presentes em 14,28% dos animais na forma de hiperplasia plana, caracterizada pelo espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas. Nestes animais também foram encontradas lesões malignas, tais como carcinoma papilífero (pTa) e carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (**Figuras 5c**), ambos na na frequência de 28,57%. O IPT (índice de Inibição da Progressão Tumoral) neste grupo foi 42,84%.

A ocorrência de urotélio normal também foi observada em 28,57% dos animais que receberam o tratamento com o OncoTherad IV. Neste grupo também constatamos a ocorrência de lesões benígnas, como hiperplasia plana em 14,28%, e lesões pré-malignas como metaplasia (**Figura 5d**) em 14,28% dos animais tratados. As lesões malignas estiveram presentes em 42,84% dos animais deste grupo, na forma de carcinoma papilífero (**Figuras 5e e 5f**). Desta forma, pode-se afirmar que o IPT dos animais tratados com o OncoTherad na via intravesical foi 57,14%.

Quando tratados com Cisplatina, os resultados das análises histopatológicas mostraram a presença de lesão benigna (hiperplasia papilífera) em apenas 14,28% dos animais (**Figura 5i**). Neste grupo as lesões malignas encontradas foram carcinoma *in situ* (pTis), carcinoma papilífero (pTa) (**Figuras 5g e 5h**) e carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (pT1), com ocorrência de 14,28%, 57,14% e

14,28% respectivamente. Nos animais tratados apenas com a Cisplatina o IPT foi de 14,28%.

O tratamento simultâneo com os dois fármacos (Cisplatina+OncoTherad) resultou na ocorrência de lesões benígnas como hiperplasia plana (**Figura 5l**) e hiperplasia papilífera, ambas com ocorrência em 14,28% dos animais. As análises histopatológicas mostraram ainda a presença de lesões malignas tais como, carcinoma papilífero (pTa) e carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria - pT1 (**Figuras 5j e 5k**), com ocorrência de 42,84% e 28,57% respectivamente. O IPT foi de 28,57% nos animais deste grupo.

Para confirmar se o IPT promovido pelas diferentes estratégias terapêuticas era estatisticamente significativo, nos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Inibição/Progressão Tumoral, comparamos o IPT dos diferentes tratamentos com o grupo MNU (Câncer) cujo IPT é zero, ou seja, que apresenta 100% de lesões malignas após a indução do CBNMI. Além disso comparamos essas estratégias entre elas, para investigar quais apresentam maior efetividade antitumoral, através do IPT. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos com OncoTherad, seja IP ou IV, promovem IPT estatisticamente significativo, comparado ao grupo MNU. Ainda, o IPT do grupo OncoTherad IV foi significativamente superior ao do grupo Cisplatina.

As análises histopatológicas dos animais tratados com o OncoTherad nas diferentes vias de administração evidenciaram, também, a ocorrência de um processo inflamatório intenso através de infiltrados de células inflamatórias presentes no urotélio destes animais. Os resultados das análises histopatológicas dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral estão representados na **Tabela 5** e as fotomicrografias das alterações histológicas mais frequentes em cada grupo são apresentadas na **Figura 5**.

Tabela 5. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV30*.

Lesões Uroteliais		OncoTherad IP (n=7)	OncoTherad IV (n=7)	Cisplatina (n=7)	Cisplatina + OncoTherad (n=7)
Ausência de Lesão	Urotélio Normal	28,57% (2)	28,57% (2)	–	–
Lesões Benignas	Hiperplasia Plana	14,28% (1)	14,28% (1)	–	14,28% (1)
	Hiperplasia Papilífera	–	–	14,28% (1)	14,28% (1)
Lesões Pré Malignas	Metaplasia Escamosa	–	14,28% (1)	–	–
	Neoplasia Intraurotelial de Baixo Grau	–	–	–	–
Lesões Malignas	Carcinoma <i>in situ</i> (Ptis)	–	–	14,28% (1)	–
	Carcinoma Papilífero (pTa)	28,57% (2)	42,84% (3)	57,14% (4)	42,84% (3)
	Carcinoma com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	28,57% (2)	–	14,28% (1)	28,57% (2)
Inibição da Progressão Tumoral (IPT)		42,84% bc	57,14% c	14,28% ab	28,57% ac

*Animais experimentais eutanasiados 30 dias após o término do tratamento. Grupos: OncoTherad IP, OncoTherad IV e Cisplatina. Grupo MNU-Câncer: IPT= 0%a (IP: tratamento via e intraperitoneal; IV tratamento via intravesical). IPT: valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

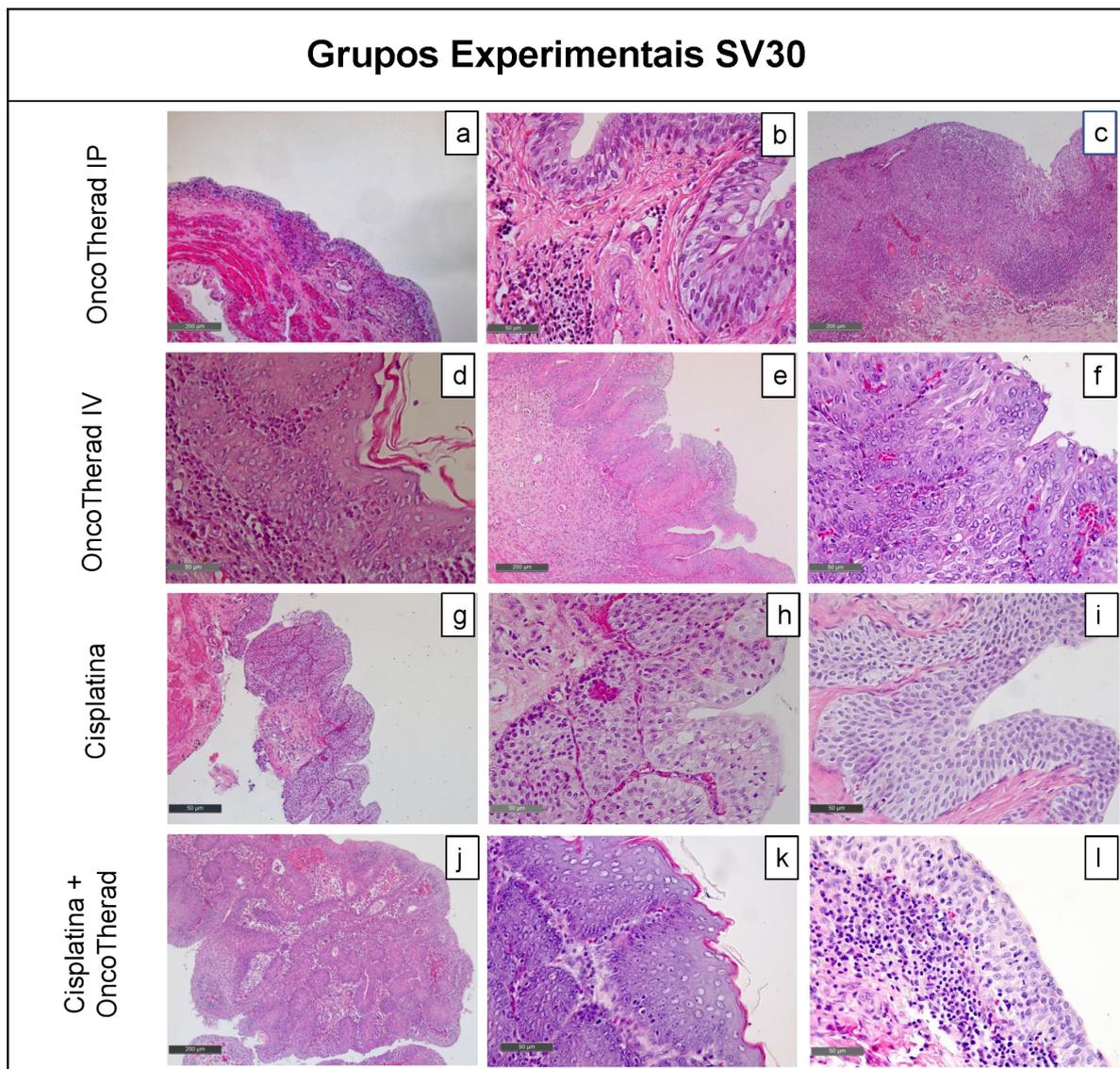


Figura 5. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos animais experimentais SV30 (1 mês após o término do tratamento). Grupos: OncoTherad IP (**a - c**), OncoTherad IV (**d - f**), Cisplatina (**g - i**) e Cisplatina+OncoTherad (**j - l**). (**a**) Urotélio normal, sem leão, semelhante ao grupo Controle; (**b**) Urotélio normal com infiltrado de células inflamatórias; (**c**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos invadindo a lâmina própria; (**e**) Metaplasia escamosa; (**e, f**) Carcinoma papilífero (pTa), caracterizado por extensas lesões papilíferas, com intensos infiltrados de células inflamatórias; (**g, h**) Carcinoma papilífero (pTa); (**i**) Hiperplasia papilífera, caracterizadas por espessamento do urotélio com ausência de atipias citológicas; (**j**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1); (**k**) pT1 com Metaplasia escamosa; e (**l**) Hiperplasia plana: espessamento do urotélio com ausência de atipias citológicas. Coloração: Hematoxilina de Haris e Eosina alcoólica.

• Análises Macroscópicas do Trato Urinário dos animais experimentais SV30

As observações feitas nos animais eutanasiados 1 mês após o término do tratamento (SV30) apresentaram um padrão distinto daquele visto logo após o término do tratamento, mostrando que em alguns dos tratamentos testados houve recuperação da estrutura do trato urinário e em outros, essas alterações estruturais se mostraram mais frequentes.

Os animais tratados com OncoTherad IP, após 30 dias, apresentavam cálculo vesical em 14,28% dos animais e neste grupo não observou-se formação de cálculo renal e hidroureter, mostrando uma boa recuperação da estrutura do trato urinário comparado àqueles eutanasiados pós-tratamento. Os animais tratados com o mesmo composto na via intravesical (OncoTherad IV) também não apresentavam cálculos renais, no entanto as alterações na bexiga urinária e ureteres foram mais frequentes 1 mês após o tratamento, sendo que neste grupo observamos a presença cálculo vesical e hidroureter na frequência de 28,57% e 42,84%, respectivamente. As alterações no trato urinário dos animais tratados com Cisplatina, em SV30, foram calculo vesical (14,28%) e hidroureter (28,57%). Enquanto que nos animais que recebeu tratamento simultâneo, com OncoTherad e Cisplatina, as alterações foram presença de cálculo vesical e hidroureter, ambos na frequência de 28,57%. Nestes animais também não houve formação de calculo renal. A **Tabela 6** mostra a frequência das alterações macroscópicas do trato urinário em cada grupo experimental.

Tabela 6. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV30 (n=7 animais/grupo).

Alterações Estruturais do Trato Urinário	OncoTherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina + OncoTherad
Cálculo Vesical	14,28% (1)	28,57% (2)	14,28% (1)	28,57% (2)
Hidroureter	Ausente	42,84% (3)	28,57% (2)	28,57% (2)
Cálculo Renal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

4.2.3 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV90

- **As estratégias terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad e Cisplatina, isolados ou em associação, apresentam IPT significativo 90 dias pós-tratamento (SV90)**

Os resultados histopatológicos encontrados nos animais, submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral, 90 dias após o término do tratamento (**Tabela 7, Figura 6**) foram diferentes daqueles encontrados anteriormente (SV30), mostrando que as diferentes estratégias terapêuticas podem apresentar melhores resultados quando prolongadas.

As análises histopatológicas das bexigas urinárias dos animais do grupo OncoTherad IP evidenciaram a ausência de lesão (urotélcio normal) em 42,84% (**Figuras 6a e 6b**) e lesões benígnas do tipo hiperplasia plana em 28,57% dos animais deste grupo (**Figura 6c**). A presença de lesões malignas foi bem menor, sendo que em 14,28% dos animais observou-se a presença de carcinoma papilífero (pTa) e a presença de carcinoma papilífero com invasão de lâmina própria (pT1) em outros 14,28% dos animais deste grupo. Sendo assim, o IPT neste grupo foi de 71,43%.

Os animais do Grupo OncoTherad IV apresentaram lesões benígnas, como hiperplasia plana e hiperplasia papilífera (**Figura 6f**), ambas em 14,28% dos animais, além de lesões pré-malignas, como neoplasia intraurotelial de baixo grau, em 14% dos animais tratados (**Tabela 7**). No entanto a presença de lesões malignas foi observada na maioria dos animais deste grupo, sendo 28,57% carcinoma papilífero - pTa e outros 28,57% carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria - pT1 (**Figuras 6d e 6e**). Considerando a presença de lesões não malignas, o IPT neste grupo foi de 42,84%.

No grupo Cisplatina, os resultados histopatológicos evidenciaram a presença de lesões benígnas, hiperplasia plana (14,28%) e hiperplasia papilífera (14,28%), e também a presença de lesões pré-malignas, como neoplasia intraurotelial de baixo grau (**Figuras 6g e 6h**) presente em 28,57% dos animais. As lesões malignas observadas neste grupo foram carcinoma *in situ* (pTis) em 14,28%, e carcinoma

papilífero (pTa) presente em 28,57% dos animais (**Figura 6i**). Neste grupo, o IPT foi de 57,14%.

Enquanto que nos animais do Cisplatina+OncoTherad, observou-se a ausência de lesão (urotélcio normal) em 28,57% (**Figura 6j**). Neste grupo também houve a presença de lesões pré-malignas, como metaplasia escamosa (**Figura 6k**) e neoplasia intraurotelial de baixo grau, ambas em 14,28% dos animais. Outros 42,84% dos animais deste grupo apresentaram lesões malignas do tipo carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria - pT1 (**Figura 6l**). O IPT neste grupo foi de 57,14%.

Entretanto, quando comparamos o IPT das quatro estratégias terapêuticas com o grupo MNU (Câncer) as análises estatísticas comprovam que este índice foi significativo em todos os grupos experimentais SV90, porém não houve diferenças estatísticas entre o IPT de cada tratamento. Os resultados das análises histopatológicas dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - SV90 estão representados na **Tabela 7** e as fotomicrografias das alterações histológicas mais frequentes em cada grupo são apresentadas na **Figura 6**.

Tabela 7. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV90*.

Lesões Uroteliais		OncoTherad IP (n=7)	OncoTherad IV (n=7)	Cisplatina (n=7)	Cisplatina + OncoTherad (n=7)
Ausência de Lesão	Urotélio Normal	42,84% (3)	–	–	28,57% (2)
Lesões Benignas	Hiperplasia Plana	28,57% (2)	14,28% (1)	14,28% (1)	–
	Hiperplasia Papilífera	–	14,28% (1)	14,28% (1)	–
Lesões Pré Malignas	Metaplasia Escamosa	–	–	–	14,28% (1)
	Neoplasia Intraurotelial de baixo grau	–	14,28% (1)	28,57% (2)	14,28% (1)
Lesões Malignas	Carcinoma <i>in situ</i> (Ptis)	–	–	14,28% (1)	–
	Carcinoma Papilífero (pTa)	14,28% (1)	28,57% (2)	28,57% (2)	–
	Carcinoma com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	14,28% (1)	28,57% (2)	–	42,84% (3)
Inibição da Progressão Tumoral (IPT)		71,43% b	42,84% b	57,14% b	57,14% b

* Animais experimentais eutanasiados 90 dias após o término do tratamento. Grupos: OncoTherad IP, OncoTherad IV e Cisplatina. Grupo MNU-Câncer: IPT= 0%a. (IP: tratamento via e intraperitoneal; IV tratamento via intravesical). IPT: valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

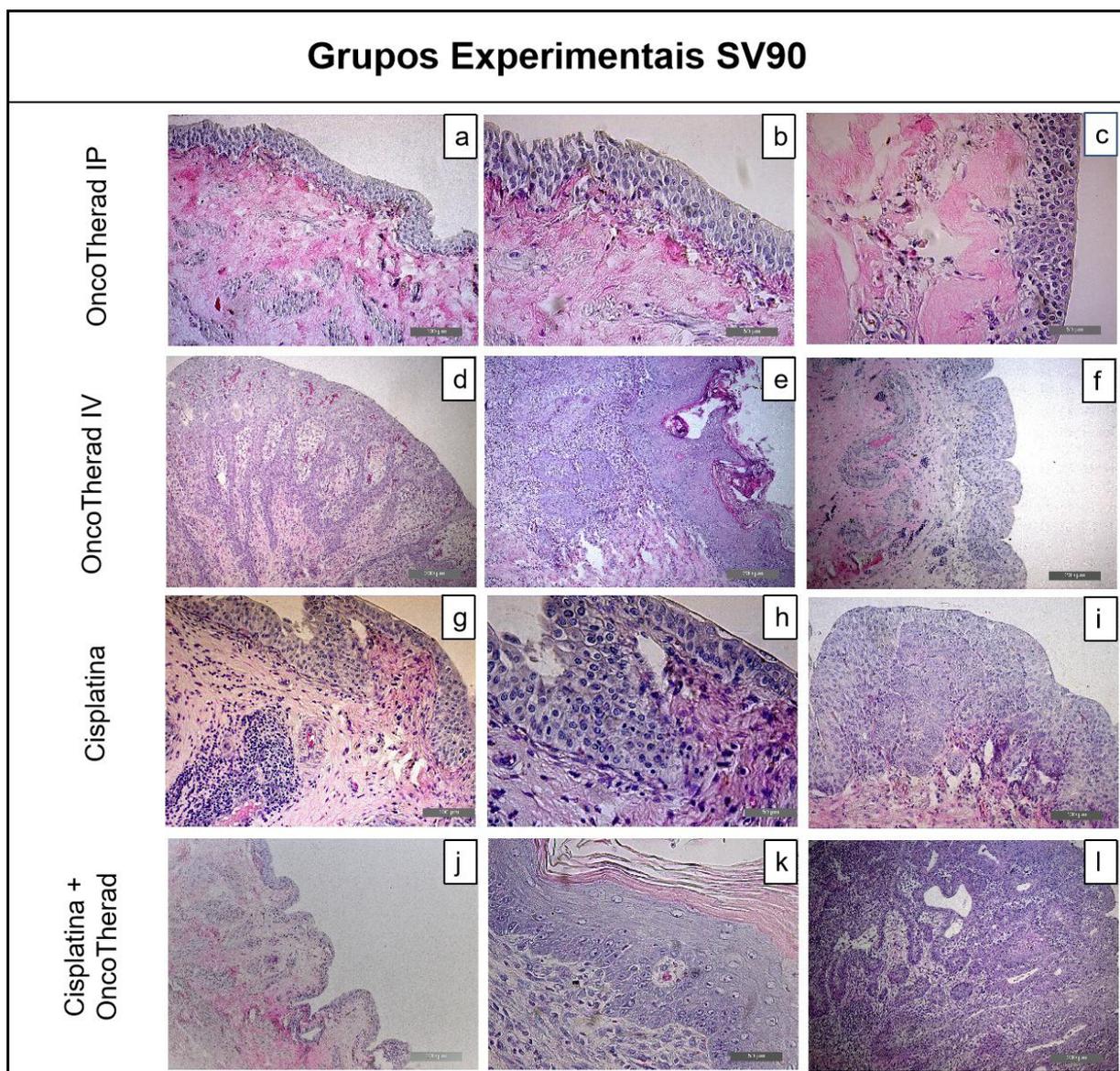


Figura 6. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV90 (eutanasiados 3 meses após o término do tratamento). Grupos: OncoTherad IP (**a - c**), OncoTherad IV (**d - f**), Cisplatina (**g - i**) e Cisplatina+OncoTherad (**j - l**). (**a,b**) Urotélio normal, semelhante ao grupo Controle (saudável); (**c**) Hiperplasia plana, caracterizado pelo espessamento do urotélio com ausência de atipias citológicas. (**d,e**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos invadindo a lâmina própria; (**f**) Hiperplasia papilífera, caracterizadas por espessamento do urotélio com ausência de atipias citológicas; (**g,h**) Neoplasia Intraurotelial de baixo grau, uma lesão pré-malígna; (**i**) Carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e perda da polaridade; (**j**) urotélio normal; (**k**) Metaplasia Escamosa, lesão pré malígna; e (**l**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1).

• Análises Macroscópicas do Trato Urinário dos animais experimentais SV90

As análises macroscópicas do trato urinário dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral, eutanasiados 90 dias após o término do tratamento estão descritas na **Tabela 8**. Nos animais do grupo OncoTherad IP, as únicas alterações estruturais encontradas foi a presença de hidroureter na frequência de 28,57%, e nestes animais não houve formação de cálculo vesical e/ou renal. Os animais tratados com o mesmo fármaco na via intravesical (OncoTherad IV) apresentavam alterações estruturais em todo o trato urinário, sendo que a frequência dessas alterações foram maiores do que as encontradas nos animais eutanasiados em momentos anteriores (Pós-Tratamento e SV30). Nesse grupo a presença de cálculo vesical foi vista em 42,84% dos animais, hidroureter em 51,84% e cálculo renal em 14,28% dos animais tratados. No grupo Cisplatina+OncoTherad, as alterações estruturais no trato urinário foram muito parecidas com o grupo tratado apenas com OncoTherad IV, sendo que a presença de hidroureter e cálculo renal foi vista na mesma frequência, no entanto a presença de cálculo vesical foi menor neste grupo (28,57%). Contudo, o grupo experimental tratado apenas com Cisplatina foi o que apresentou melhor recuperação das alterações estruturais do trato urinário, sendo que no momento da eutanásia esses animais apresentavam ureteres normais e ausência de cálculo vesical e/ou renal.

Tabela 8. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV90 (n=7 animais/grupo).

Alterações Estruturais do Trato Urinário	OncoTherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina + OncoTherad
Cálculo Vesical	Ausente	42,84% (3)	Ausente	28,57% (2)
Hidroureter	28,57% (2)	51,84% (4)	Ausente	51,84% (4)
Cálculo Renal	Ausente	14,28% (1)	Ausente	14,28% (1)

- **SV180 - Indução do CBNMI nos animais experimentais com o carcinógeno ENU (N-etil-N-nitrosourea)**

Durante o desenvolvimento deste trabalho, fomos surpreendidos pela descontinuidade da fabricação e distribuição do carcinógeno MNU, desta forma, tivemos que optar por um novo carcinógeno, N-etil-N-nitrosourea (ENU - Sigma, St. Louis, MO, EUA), indicado para a substituição do anterior. Diante desta adversidade, e para dar continuidade aos experimentos do Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral, houve a necessidade de verificar se a indução ao CBNMI com o ENU diferia daquela feita com MNU, uma vez que os próximos grupos experimentais seriam instilados com ENU para a indução do CBNMI. Para isso, criamos um novo grupo (Câncer-ENU), controle “Câncer”, em que cada animal (n=9) recebeu três doses intravesicais do carcinógeno ENU (100mg/Kg) diluída em solução DMSO (Dimethyl sulfoxide) 50%, conforme orientação do fabricante, a cada 15 dias. O número de doses foi determinado à partir de experimentos pilotos feitos por nosso grupo de pesquisa, sendo que 4 doses deste carcinógeno, como era feito anteriormente com MNU, resultou em taxa de mortalidade elevada, além da evolução do CB para o fenótipo músculo-invasivo nos animais experimentais. O esquema de tratamento dos animais deste grupo (ENU-Câncer) estão representados na **Figura 7**.

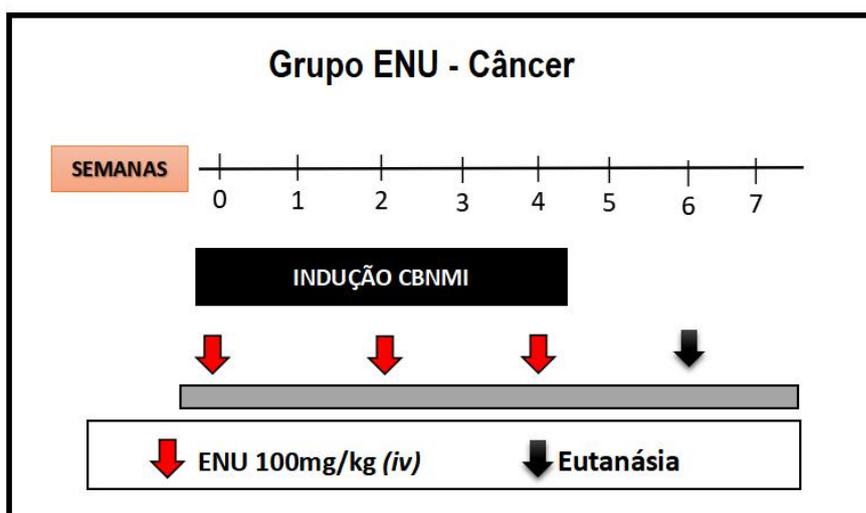


Figura 7. Indução do CBNMI do Grupo Experimental ENU-Câncer (n=9). As setas vermelhas indicam a instilação de ENU (N-Nitroso-N-Etilureia), na dose 100mg/kg, via intravesical. A seta preta indica o momento da eutanásia dos animais.

Os resultados histopatológicos mostraram que a indução ao CBNMI com o carcinógeno ENU foi eficiente e promoveu lesões neoplásicas malignas em todos os animais (n=9), sendo que os resultados das análises histopatológicas da bexiga urinária destes animais evidenciaram que 100% apresentavam lesões do tipo pTa (carcinoma papilífero sem invasão da lâmina própria). As fotomicrografias das alterações histológicas deste grupo estão apresentadas na **Figura 8**.

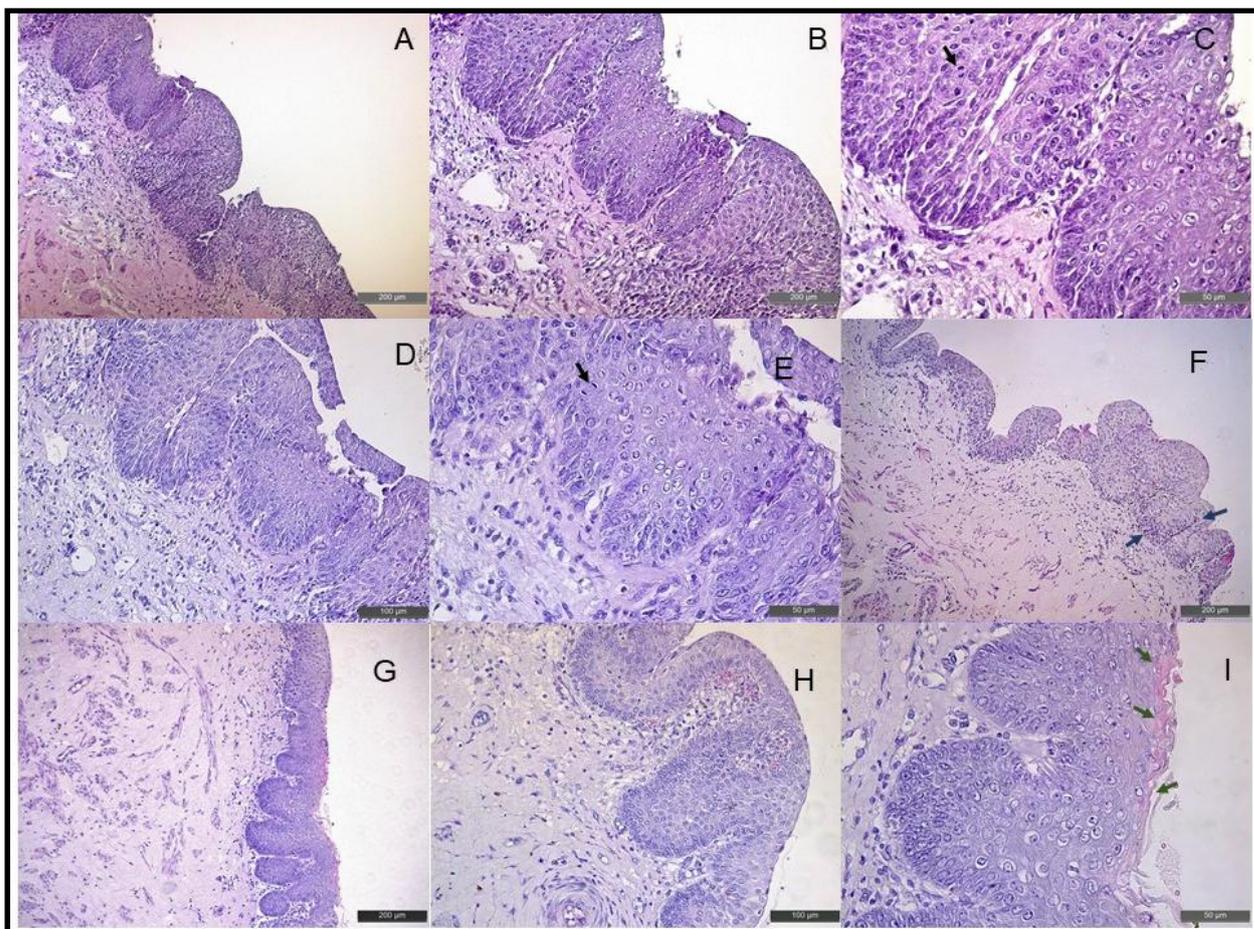


Figura 8. Fotomicrografias das lesões uroteliais do Grupo ENU-Câncer: **(A - F)** Carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado.; **(G - I)** Carcinoma papilífero invertido, caracterizado por lesões papilíferas com crescimento voltado para a lâmina basal (pTa “invertido”), e presença de **(I)** metaplasia escamosa. As setas pretas apontando figuras de mitose, indicam alta atividade de divisão celular **(B,E)**; Setas azul apontando aumento de células inflamatórias no urotélio **(F)**; Setas verdes apontando focos de metaplasia **(I)** na superfície do urotélio.

• **SV180 - Taxa de Mortalidade nos diferentes grupos experimentais**

A estratégia terapêutica baseada no tratamento simultâneo com OncoTherad e Cisplatina promove maior taxa de mortalidade

No Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - 180 dias após o tratamento (SV180), além das análises e observações feitas nos grupos experimentais anteriores, contabilizamos nestes animais a taxa de mortalidade, visto que o período experimental era muito longo para o animal doente. O n inicial de cada grupo experimental submetido à este teste foi de 8 animais por grupo e a taxa de mortalidade está ilustrada na **Tabela 9**. Cabe ressaltar que nos outros grupos experimentais (eutanasiados até 3 meses após o término do tratamento) não houve mortalidade após o início do tratamento, em todas as estratégias terapêuticas testadas neste estudo.

A maior taxa de mortalidade (75,0%) foi vista no grupo Cisplatina+OncoTherad, neste grupo a mortalidade foi estatisticamente maior, comparado aos grupos OncoTherad IP e Cisplatina. A mortalidade nos animais tratados apenas com uma estratégia terapêutica foi menor, sendo que no grupo OncoTherad IV essa taxa foi de 50,0% e quando tratados apenas com Cisplatina a taxa de mortalidade foi de 25,0%. A menor mortalidade foi vista no grupo OncoTherad IP, nesses animais a taxa de mortalidade, 6 meses após o término do tratamento, foi de apenas 12,5%.

Tabela 9. Taxa de Mortalidade e Sobrevida dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - SV180.

Grupos Experimentais	OncoTherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina + OncoTherad
n inicial	8	8	8	8
n final	7	4	6	2
Taxa de Mortalidade	12,5% a	50,0% ab	25% a	75% b
Taxa de Sobrevida	87,5%	50,0%	75%	25%

4.2.4 - Análises histopatológicas, Índice de Inibição da Progressão Tumoral e Análises macroscópicas do trato urinário dos grupos experimentais SV180

- **As estratégias que apresentam menores taxas de mortalidade também apresentam maiores IPT* no período experimental mais longo**

As análises histopatológicas da bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV180 (6 meses após o término do tratamento) evidenciaram a presença de lesões malignas na frequência de 100% em todos os grupos experimentais. Os resultados estão representados na **Tabela 10** e as fotomicrografias das alterações histológicas mais frequentes em cada grupo são apresentadas na **Figura 9**.

No grupo tratado com OncoTherad IP as lesões encontradas foram carcinoma papilífero (pTa) em 42,9% e carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (pT1) em 57,1% dos animais deste grupo (**Figuras 9a - 9c**). Já no grupo tratado com OncoTherad IV as lesões malignas pTa (**Figuras 9e e 9f**) e pT1 (**Figura 9d**) foram encontradas em 25% e 75% dos animais, respectivamente.

O grupo Cisplatina apresentou lesões malignas 50% do tipo pTa (**Figuras 9i**) e 50% do tipo pT1 (**Figuras 9g e 9h**), enquanto que no Grupo Cisplatina+OncoTherad, que recebeu tratamento simultâneo com os dois fármacos (Cisplatina intraperitoneal e OncoTherad intravesical) observamos a presença de carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (pT1) em 100% dos animais (**Figuras 9j - 9l**).

Considerando que a indução ao CBNMI com NNN promove carcinoma papilífero (pTa) em 100% dos animais, nestes grupos podemos também considerar um índice inibição da progressão tumoral (IPT*), uma vez que alguns destes animais não evoluíram para um diagnóstico pior do que aquele inicial (pTa). Sendo assim, os índices IPT* nos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV180 seriam de 42,9% nos animais tratados com OncoTherad IP, 25,0% nos animais tratados com o mesmo composto na via intravesical (OncoTherad IV) e 50,0% nos animais tratados apenas com Cisplatina. Nos animais do Grupo Cisplatina+OncoTherad esse índice foi zero. As análises estatísticas demonstraram

que o IPT* nos grupos OncoTherad IP e Cisplatina foram estatisticamente maiores, comparado aos grupos MNU e aos demais tratamentos.

Tabela 10. Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - SV180*

Lesões Uroteliais		OncoTherad IP (n=7)	OncoTherad IV (n=4)	Cisplatina (n=6)	Cisplatina + OncoTherad (n=2)
Ausência de Lesão	Urotélio Normal	–	–	–	–
Lesões Benignas	Hiperplasia Plana	–	–	–	–
	Hiperplasia Papilífera	–	–	–	–
Lesões Pré Malignas	Metaplasia Escamosa	–	–	–	–
	Neoplasia Intraurotelial de baixo grau	–	–	–	–
Lesões Malignas	Carcinoma <i>in situ</i> (Ptis)	–	–	–	–
	Carcinoma Papilífero (pTa)	42,9% (3)	25,0% (1)	50,0% (3)	–
	Carcinoma com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	57,1% (4)	75,0% (3)	50,0% (3)	100,0% (2)
Inibição da Progressão Tumoral (IPT)*		42,9% b	25,0% a	50,0% b	0 a

Animais experimentais eutanasiados 180 dias após o término do tratamento. Grupos: OncoTherad IP, OncoTherad IV e Cisplatina. (IP: tratamento via e intraperitoneal; IV tratamento via intravesical). IPT:considerando que o ENU promove a ocorrência de pTa em 100% dos animais induzidos ao CBNMI. Grupo ENU-Câncer: IPT= 0%a Valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

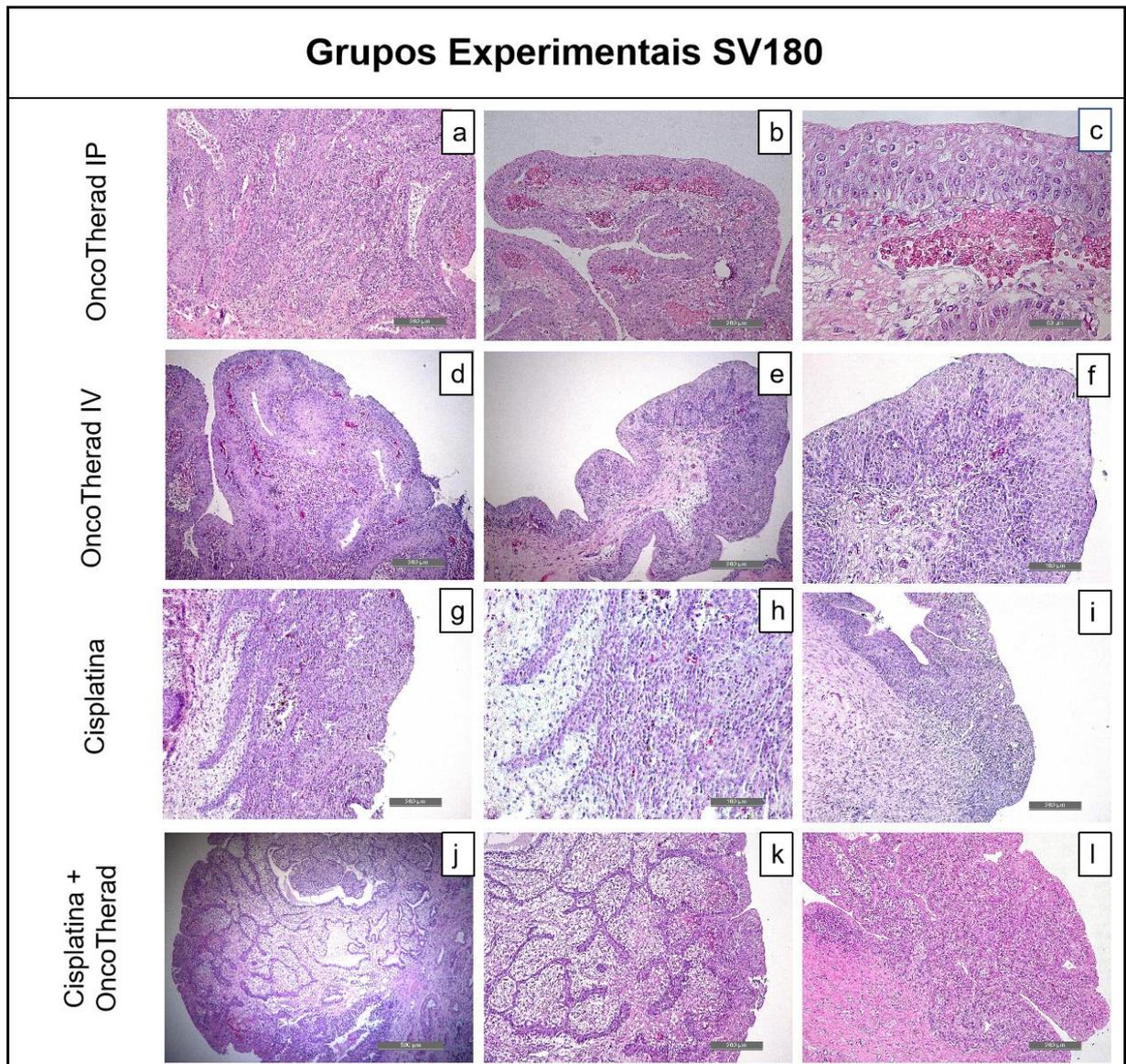


Figura 9. Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos experimentais SV180 (eutanasiados 6 meses após o término do tratamento). Grupos: OncoTherad IP (**a - c**), OncoTherad IV (**d - f**), Cisplatina (**g - i**) e Cisplatina+OncoTherad (**j - l**). (**a**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1); (**b,c**) pT1, com aumento de vascularização urotelial; (**d**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1); (**e,f**) Carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas; (**g,h**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1); (**i**) Carcinoma papilífero (pTa); (**j,k,l**) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1).

• **Análises Macroscópicas do Trato Urinário dos animais experimentais SV180**

As alterações estruturais no trato urinário dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - 180 dias após o tratamento, foram observadas e estão ilustradas na **Tabela 11**. Nesses animais, é importante considerar também a taxa de mortalidade e considerar que a frequência das alterações observadas é calculada a partir do n final de cada grupo (ver Tabela 8). Nos animais tratados com OncoTherad na via intraperitoneal não observamos presença de cálculo vesical e/ou renal, sendo que este grupo apresentou apenas presença de hidroureter na frequência de 42,90%. O grupo tratado com o mesmo fármaco na via intravesical apresentou alterações estruturais em todo o trato urinário, tais como presença de calculo vesical em 50,00%, hidroureter em 25,00% e presença de cálculo renal em 25,00% dos animais. Quando tratados apenas com Cisplatina, após 6 meses, os animais não apresentavam cálculo renal e/ou vesical, no entanto a frequência de hidroureter foi de 33,30% nos animais deste grupo. Os animais tratados simultaneamente com OncoTherad e Cisplatina não apresentavam alterações no trato urinário, entretanto este tratamento apresentou maior taxa de mortalidade.

Tabela 11. Análise Macroscópica do Trato urinário dos animais experimentais SV180.

Alterações Estruturais do Trato Urinário	OncoTherad IP (n=7)	OncoTherad IV (n=4)	Cisplatina (n=6)	Cisplatina + OncoTherad (n=2)
Cálculo Vesical	Ausente	50,0% (2)	Ausente	Ausente
Hidroureter	42,9% (3)	25,0% (1)	33,3% (2)	Ausente
Cálculo Renal	Ausente	25,0% (1)	Ausente	Ausente

4.3 - Análises de Imunohistoquímica dos diferentes grupos experimentais

As análises de imunohistoquímica foram feitas para os seguintes anticorpos primários : p53, p21, PTEN, HRAS-KRAS, Pi3K, AKT e mTOR. As proteínas detectadas indicam vias e situações específicas e de grande importância para o entendimento da inibição/progressão tumoral do CBNMI frente às diferentes estratégias terapêuticas. Para analisar os resultados das imunohistoquímicas iremos, primeiramente, comparar as diferentes estratégias terapêuticas dentro de um mesmo período experimental com os grupos Controle e MNU (CBNMI sem tratamento). No segundo momento faremos uma comparação das diferentes estratégias terapêuticas dentro de um mesmo período de sobrevivência pós-tratamento (SV30, SV90 e SV180) e, posteriormente, iremos analisar cada estratégia terapêutica com os grupos Controle e MNU nos diferentes períodos experimentais (Pós-Tratamento, SV30, SV90 e SV180).

4.3.1 - Análises das Imunohistoquímicas dos Grupos experimentais Pós-Tratamento

- **O tratamento com OncoTherad promove redução da imunorreatividade do antígeno p53 e aumento do p21, enquanto que o inverso acontece no tratamento com Cisplatina**

Os resultados das análises de imunohistoquímica dos grupos experimentais Pós-Tratamento estão apresentados na **Tabela 12** e nas **Figuras 10, 11 e 12**. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo na imunorreatividade do antígeno p53 no grupo MNU (**Figura 10C**) e no grupo tratado com Cisplatina (**Figura 10I**), comparado ao grupo Controle (sadios) que apresentou imunorreatividade fraca para este antígeno (**Figura 10A**), no entanto, uma redução significativa foi vista nos grupos tratados com OncoTherad (**Figuras 10E e 10G**), independente da via de

administração do fármaco (IP ou IV), comparados ao grupo MNU (Câncer). Em contrapartida, na análise da imunorreatividade do antígeno p21 observou-se um aumento significativo nos grupos tratados com OncoTherad (**Figuras 10F e 10H**), comparado aos demais grupos experimentais.

A **Tabela 12** mostra a porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias dos cinco grupos experimentais, bem como os scores (1, 2, 3 e 4) que os classificam (através da % de imunorreatividade) como: 1- muito fraca (até 25%), 2- fraca (até 50%), 3- moderada (até 75%) e 4- forte (acima de 75%), e também as diferenças estatísticas entre os grupos (indicada pelas diferentes letras minúsculas).

Tabela 12 Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratos Fisher 344 dos grupos experimentais Pós-Tratamento.

Antígenos	Grupos Experimentais				
	Controle (n=5)	MNU (n=5)	OncoTherad IP (n=6)	OncoTherad IV (n=6)	Cisplatina (n=5)
p53	2 (37,4%) a	3 (65,0%) b	2 (48,7%) a	3 (53,1%) a	3 (65,8%) b
p21	3 (53,2%) a	2 (41,3%) a	4 (76,8%) b	4 (78,1%) b	3 (61,5%) a
Hras-Kras	2 (25,2%) a	2 (39,2%) bc	2 (37,3%) b	2 (45,8%) c	2 (40,4%) bc
PTEN	2 (26,7%) a	2 (32,4%) a	2 (41,7%) ab	3 (50,6%) b	3 (55,3%) b
Pi3K	2 (31,9%) a	2 (43,0%) ab	2 (44,0%) ab	2 (43,3%) ab	3 (52,0%) b
AKT	2 (33,5%) a	2 (41,9%) ac	3 (55,1%) b	2 (45,6%) bc	2 (38,0%) ac
mTOR	2 (34,3%) a	3 (57,5%) b	3 (69,8%) b	3 (68,0%) b	3 (60,9%) b

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às médias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, Pi3K AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. pTEN: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

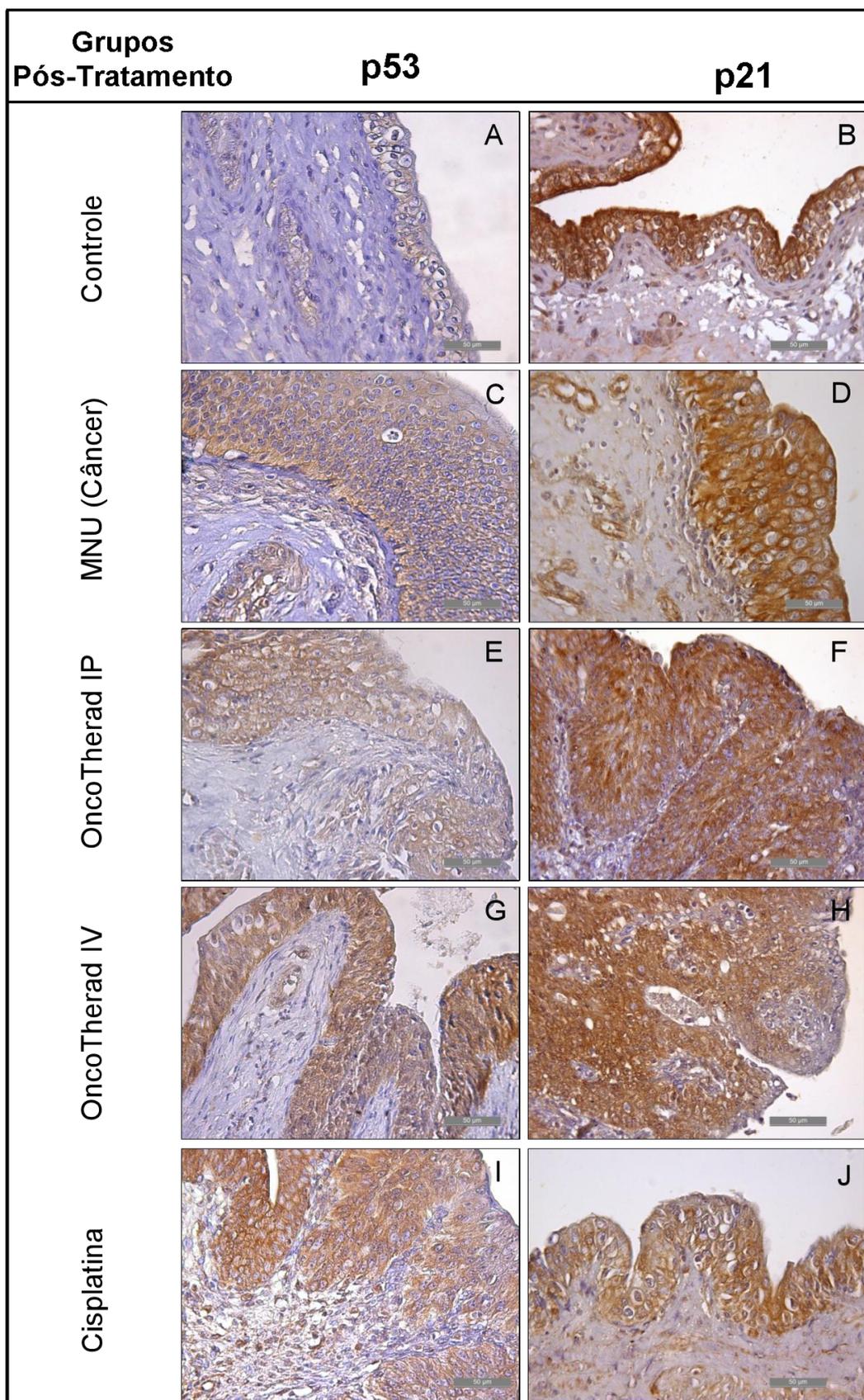


Figura 10. Imunomarcção para os antígenos p53 e P21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

A imunorreatividade para o antígeno HRAS-KRAS, comparado ao grupo controle (sadios), foi significativamente maior nos animais do grupo MNU e também nos grupos tratados com as diferentes estratégias terapêuticas testadas neste estudo (**Figura 11**). Observou-se ainda um aumento significativo nos animais tratados com OncoTherad IV (**Figura 11H**), comparado com o grupo tratado com o mesmo fármaco na via intraperitoneal (**Figura 11F**). Já na análise da imunorreatividade para o antígeno PTEN, comparado ao grupo MNU (Câncer), um aumento significativo foi visto no grupo tratados com OncoTherad IV (**Figura 11G**) e no grupo tratado com Cisplatina (**Figura 11I**). Nos animais tratados com OncoTherad IP, embora apresentassem um aumento na média de porcentagem de imunorreatividade (**Tabela 12**), não houve diferença estatística significativa comparado ao grupo MNU.

Na análise das imunohistoquímicas do antígenos da via Pi3K/AKT/mTOR (**Figura 12**) observamos que as diferentes estratégias terapêuticas testadas não promoveram redução significativa na imunorreatividade do antígeno Pi3K, comparado ao grupo MNU (Câncer). Entretanto, para o antígeno AKT um aumento significativo foi visto no grupo tratado com OncoTherad IV (**Figura 12K**), comparados aos grupos MNU (**Figura 12E**) e Cisplatina (**Figura 12N**). A imunorreatividade para o antígeno mTOR foi significativamente maior no grupo MNU (**Figura 12F**), comparado ao grupo controle (**Figura 12C**). As diferentes estratégias terapêuticas apresentaram aumento na média de imunorreatividade para o antígeno mTOR, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo MNU (Câncer).

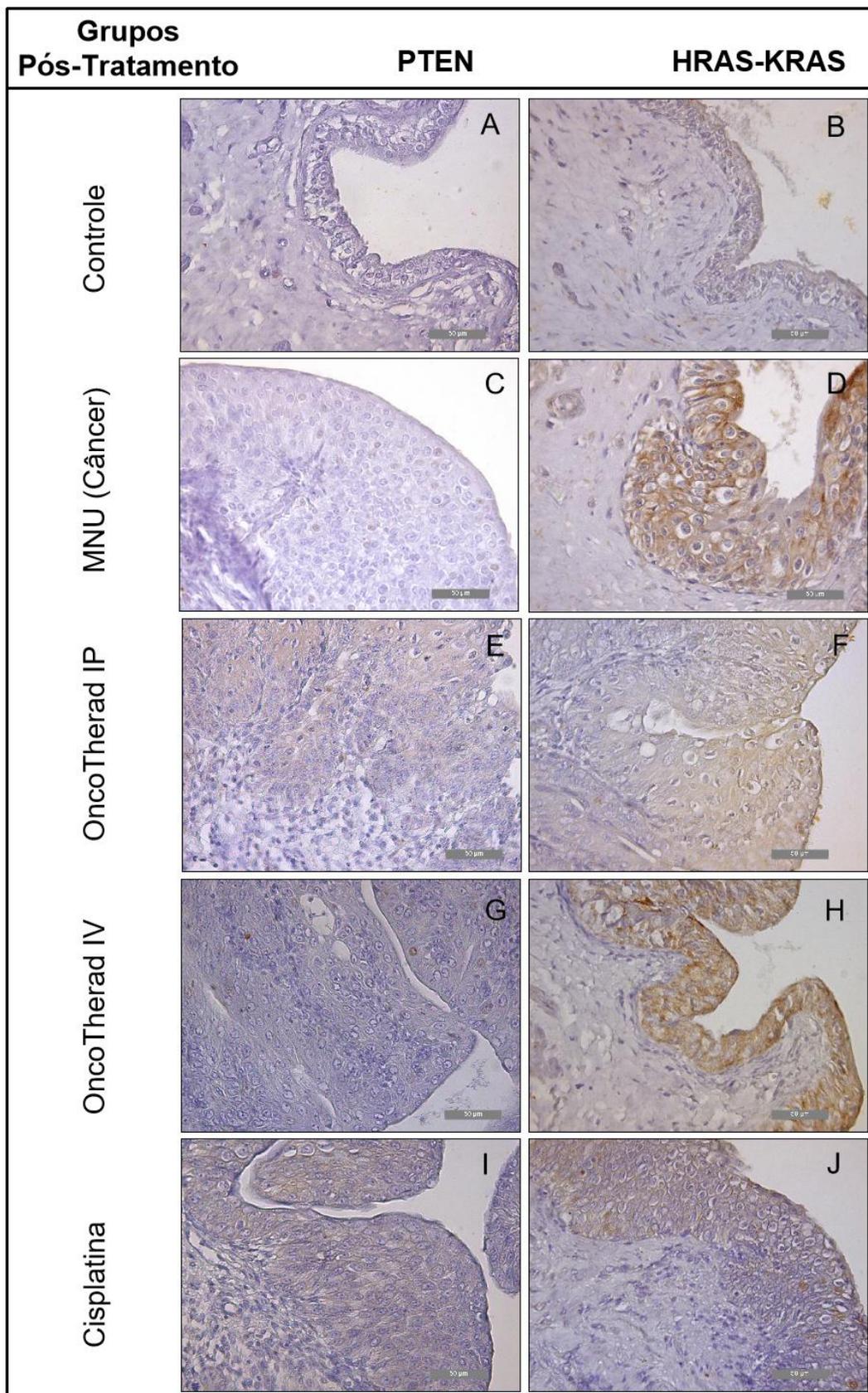


Figura 11. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

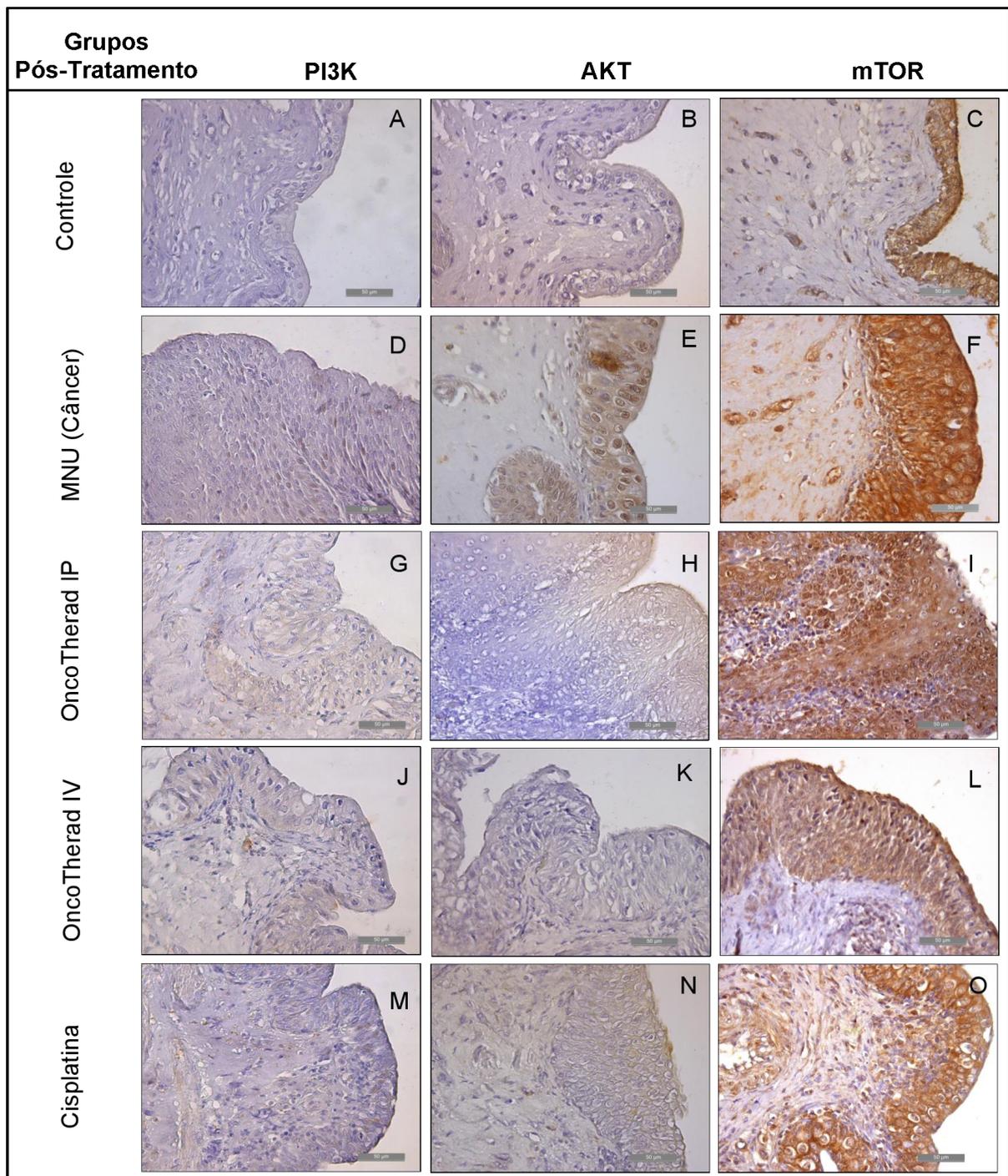


Figura 12. Imunomarcção para os antígenos Pi3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais Pós-Tratamento. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

4.3.2. Análises das imunohistoquímicas dos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral

Na análise das imunohistoquímicas dos grupos submetidos ao teste de sobrevida comparamos as diferentes estratégias terapêuticas, entre elas, para verificar se havia diferença significativa na imunorreatividade dos antígenos no mesmo período experimental usando as diferentes modalidades de tratamento: Imunoterapia (OncoTherad) nas duas vias de administração (IP e IV), quimioterapia (Cisplatina) e a associação Imunoterapia+quimioterapia (Cisplatina+OncoTherad).

• SV30 - A imunorreatividade do antígeno p21 é maior nos grupos tratados com OncoTherad IV ou Cisplatina

Nossos resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade do antígeno p53, comparando as quatro modalidades de tratamento testadas, no entanto um aumento significativo na imunorreatividade do antígeno p21 pode ser observado no grupo tratado com OncoTherad IV e no grupo tratado com Cisplatina, quando comparados ao grupo OncoTherad IP (**Tabela 13 e Figura 13**).

Tabela 13: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais SV30.

Antígenos	Grupos Experimentais SV30 (n=7/grupo)			
	OncoTherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina + OncoTherad
p53	2 (47,5%) a	3 (50,5%) a	3 (61,0%) a	2 (46,9%) a
p21	2 (49,8%) a	3 (62,0%) b	3 (64,5%) b	3 (58,0%) ab
Hras-Kras	2(44,4%) a	3 (60,5%) b	2 (44,4%) a	2 (47,6%) a
PTEN	2 (44,8%) a	3 (51,0%) a	3 (51,9%) a	3 (50,3%) a
Pi3K	3 (51,0%) a	3 (53,5%) a	3 (61,8%) a	3 (63,0%) a
AKT	3 (53,5%) a	3 (66,3%) b	2 (41,5%) a	2 (49,5%) a
mTOR	3 (64,7%) a	3 (69,4%) a	3 (64,2%) a	3 (68,1%) a

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às medias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p21, Hras-Kras, Pi3K AKT: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. p53, PTEN, mTOR: ANOVA. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

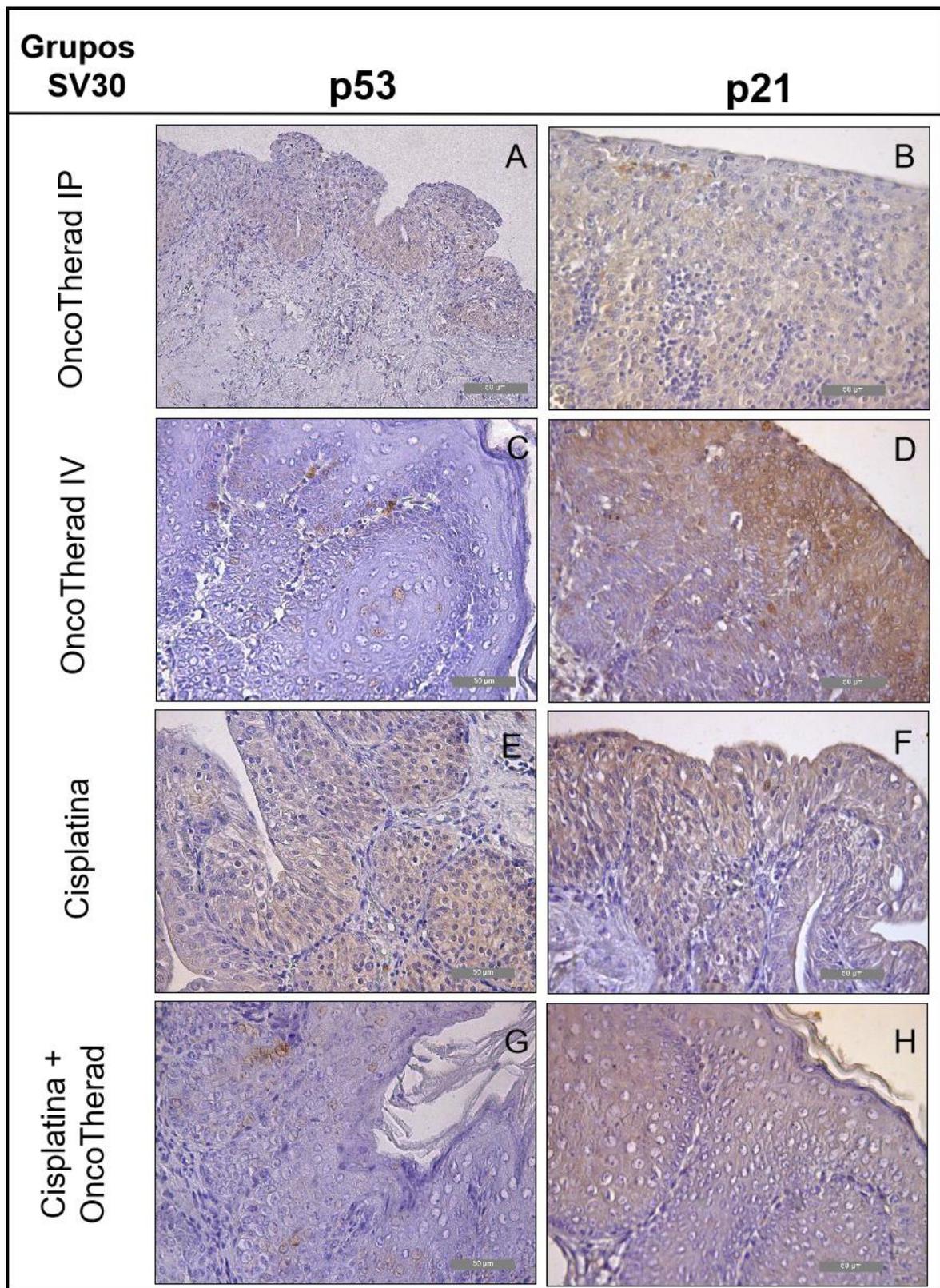


Figura 13. Imunomarcacão para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelaco: DAB, Contra-coloraco: Hematoxilina de Harris.

Analisando as quatro estratégias terapêuticas SV30, observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade para os antígenos PTEN, PI3K e mTOR. Já a imunorreatividade para o antígenos HRAS-KRAS e AKT foi significativamente maior no grupo tratado com OncoTherad IV, comparado aos demais grupos. As **Figuras 14 e 15** ilustram a imunomarcação destes antígenos nos grupos experimentais SV30.

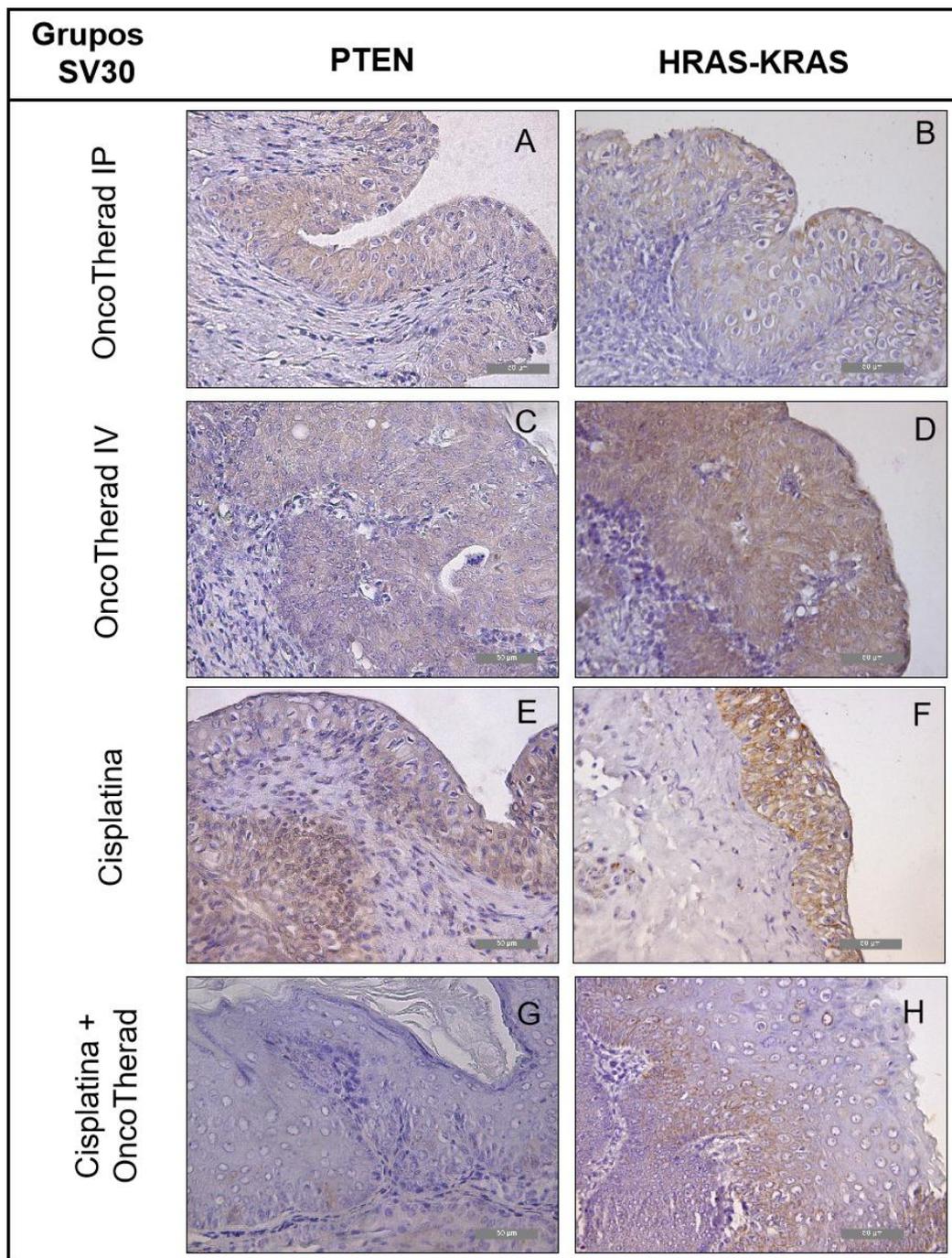


Figura 14. Imunomarcação para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

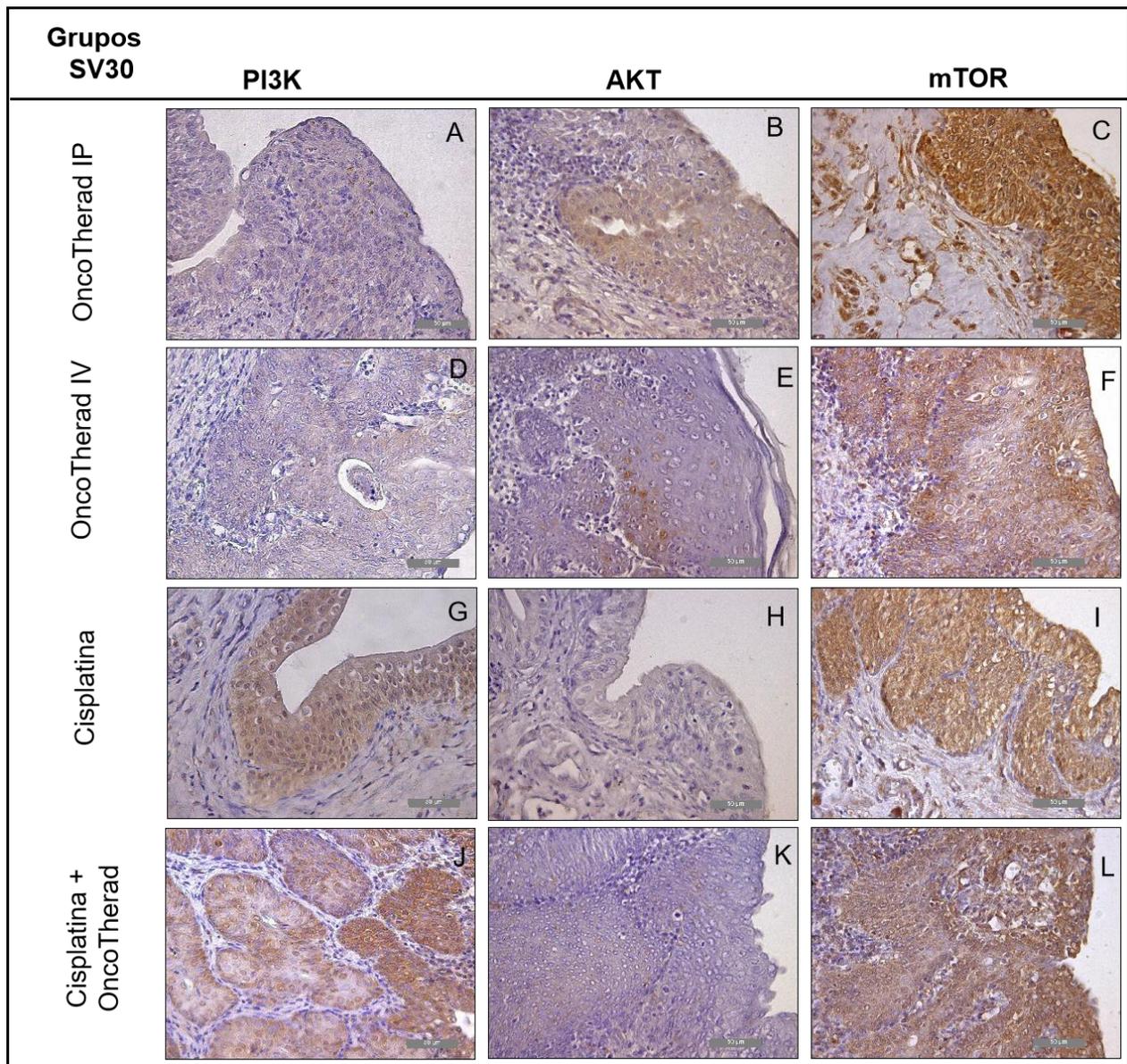


Figura 15. Imunomarcção para os antígenos Pi3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV30. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

• **SV90 - A imunorreatividade dos antígenos Pi3K e mTOR são menores nos grupos tratados com OncoTherad IP ou Cisplatina**

As análises das imunohistoquímicas dos animais submetidos ao teste de sobrevivência e eutanasiados 90 dias após o término do tratamento (SV90) demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade para os antígenos p21, HRAS-KRAS e PTEN, comparando as quatro estratégias terapêuticas testadas neste estudo. Entretanto, uma redução significativa na imunorreatividade para o antígeno p53 pode ser observado no grupo tratado com Cisplatina e no grupo tratado com Cisplatina+OncoTherad (quimioterapia+imunoterapia), quando comparados ao grupo OncoTherad IV. Esses resultados são apresentados na **Tabela 14 e as Figuras 16 e 17**.

Tabela 14: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratos Fisher 344 dos grupos experimentais SV90.

Antígenos	Grupos Experimentais SV90 (n=7/grupo)			
	OncoTherad IP	OncoTherad IV	Cisplatina	Cisplatina + OncoTherad
p53	2 (48,3%) ab	3 (55,9%) a	2 (41,2%) b	2 (44,2%) b
p21	3 (65,8%) a	3 (64,4%) a	3 (53,1%) a	3 (70,5%) a
Hras-Kras	2 (32,9%) a	1 (25,0%) a	2 (40,3%) a	2 (29,2%) a
PTEN	2 (45,2%) a	3 (53,1%) a	2 (41,8%) a	2 (47,1%) a
Pi3K	2 (42,8%) a	3 (56,2%) b	2 (42,3%) a	2 (45,1%) ab
AKT	2 (46,5%) ac	3 (54,1%) a	2 (28,9%) b	2 (35,0%) bc
mTOR	3 (53,7%) a	3 (65,2%) b	3 (55,0%) a	3 (71,1%) b

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às médias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN, Pi3K: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

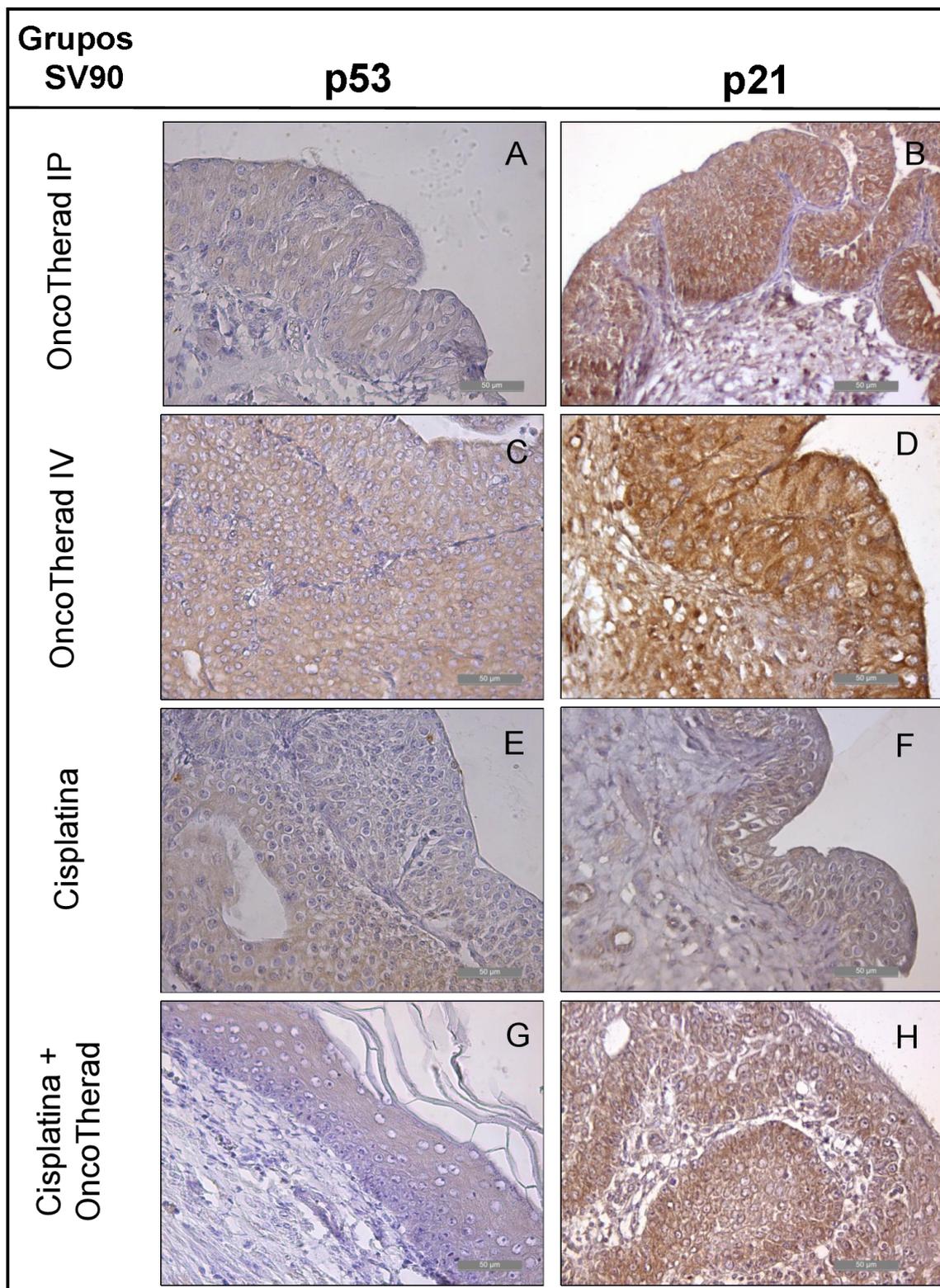


Figura 16. Imunomarcção para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

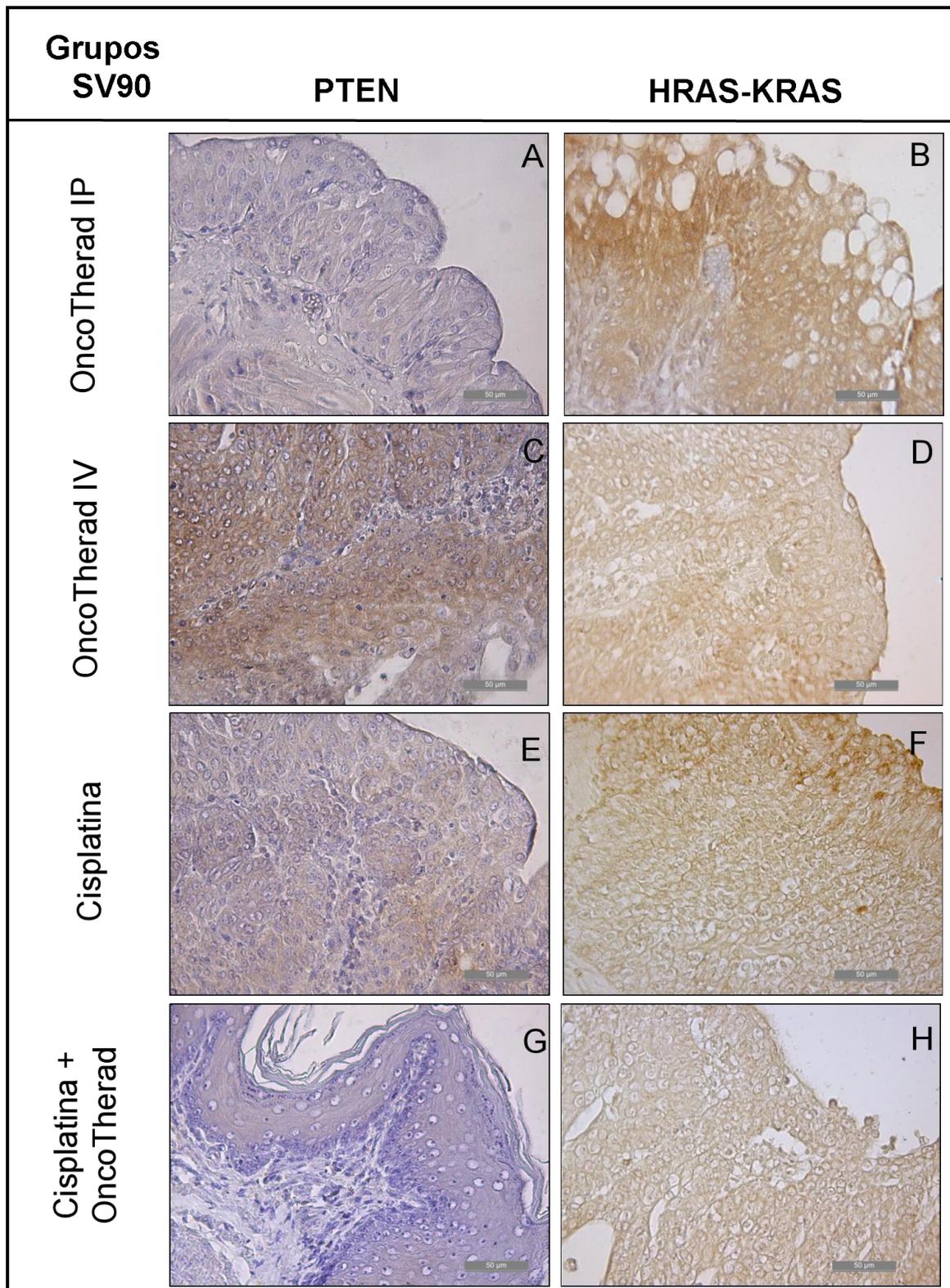


Figura 17. Imunomarcção para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Na análise da imunorreatividade dos antígenos da via Pi3K/AKT/mTOR, comparando as quatro estratégias terapêuticas entre si, observamos uma diminuição significativa na imunorreatividade do antígeno Pi3K nos grupos OncoTherad IP e Cisplatina, comparado ao grupo tratado com OncoTherad IV. Já nos grupos tratados com Cisplatina pudemos observar uma diminuição estatisticamente significativa na imunorreatividade do antígeno AKT, comparado aos grupos tratados com OncoTherad, e analisando a imunorreatividade do antígeno mTOR observamos uma diminuição significativa no grupo tratado com OncoTherad IP e no grupo tratado apenas com Cisplatina (**Tabela 14**). As fotomicrografias da imunomarcação destes antígenos são apresentados na **Figura 18**.

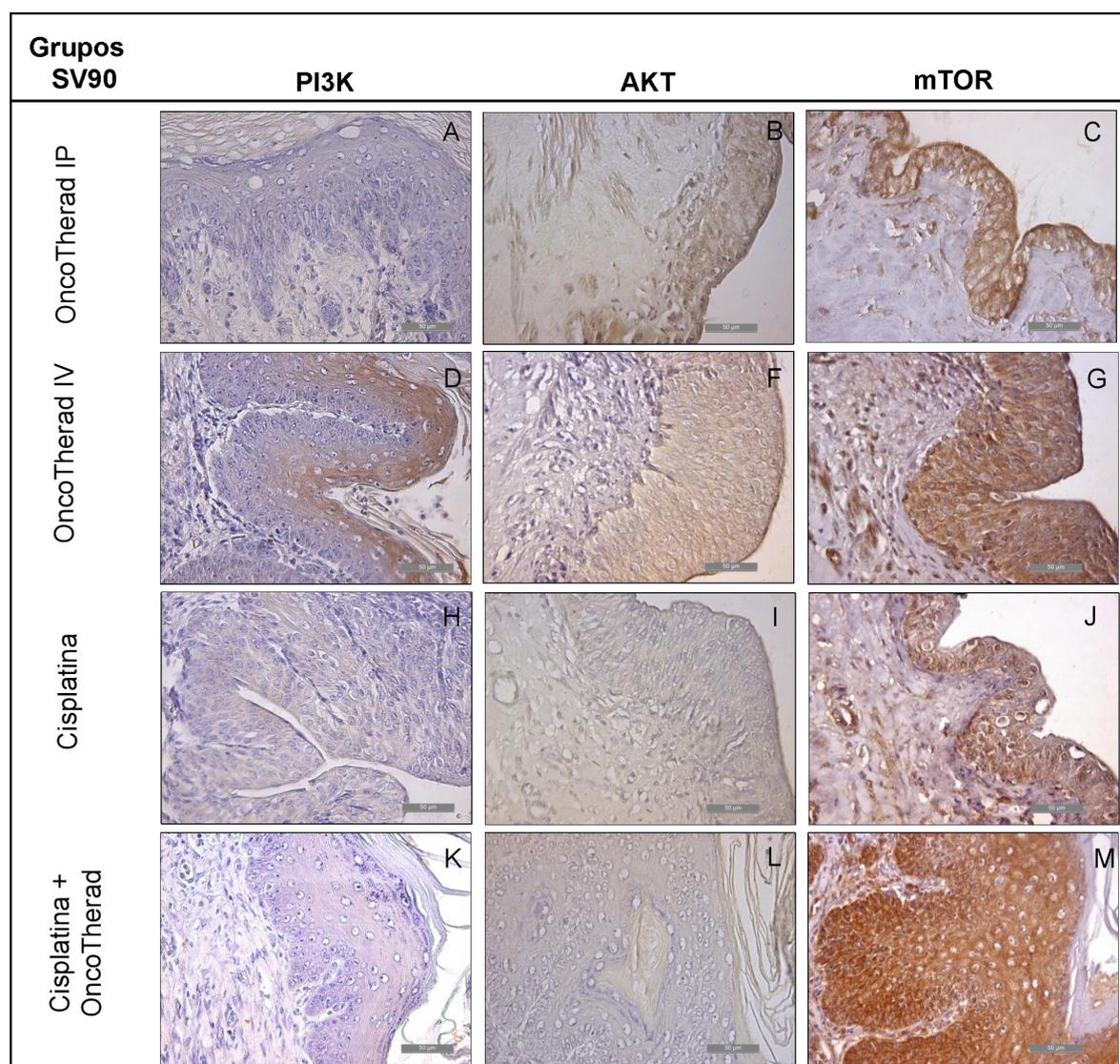


Figura 18. Imunomarcação para os antígenos PI3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV90. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

- **SV180 - A imunorreatividade do antígeno p21 é menor no grupo tratado com Cisplatina+OncoTherad do que quando os fármacos são administrados isoladamente**

As análises das imunohistoquímicas dos grupos experimentais submetidos ao teste de sobrevivência e eutanasiados 180 dias após o término do tratamento (SV180), observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade dos antígenos p53, HRAS-KRAS, PTEN e AKT, comparando as quatro estratégias terapêuticas testadas neste estudo. No entanto um aumento significativo na imunorreatividade do antígeno p21 pode ser observado no grupo tratado com OncoTherad IV e no grupo tratado apenas com Cisplatina. A **Tabela 15** mostra os resultados das análises de imunohistoquímica nos grupos SV180 e as **Figuras 19 e 20** mostram as fotomicrografias para os antígenos p53, p21, HRAS-KRAS e PTEN.

Tabela 15: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratos Fisher 344 dos grupos experimentais SV180.

Antígenos	Grupos Experimentais SV180			
	OncoTherad IP (n=7)	OncoTherad IV (n=4)	Cisplatina (n=6)	Cisplatina + OncoTherad (n=2)
p53	3 (52,1%) a	3 (61,9%) a	3 (56,2%) a	3 (52,5%) a
p21	3 (54,0%) a	4 (75,4%) b	3 (69,0%) b	2 (47,7%) a
Hras-Kras	2 (35,7%) a	2 (37,9%) a	2 (37,6%) a	2 (33,1%) a
PTEN	2 (43,9%) a	2 (45,3%) a	3 (52,4%) a	2 (42,3%) a
Pi3K	2 (43,8%) a	3 (50,1%) ab	3 (57,7%) b	2 (48,8%) ab
AKT	2 (37,2%) a	2 (45,6%) a	2 (39,0%) a	2 (29,8%) a
mTOR	3 (57,0%) a	4 (78,2%) b	3 (67,9%) ab	3 (56,9%) a

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às médias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, Pi3K AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN: ANOVA. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

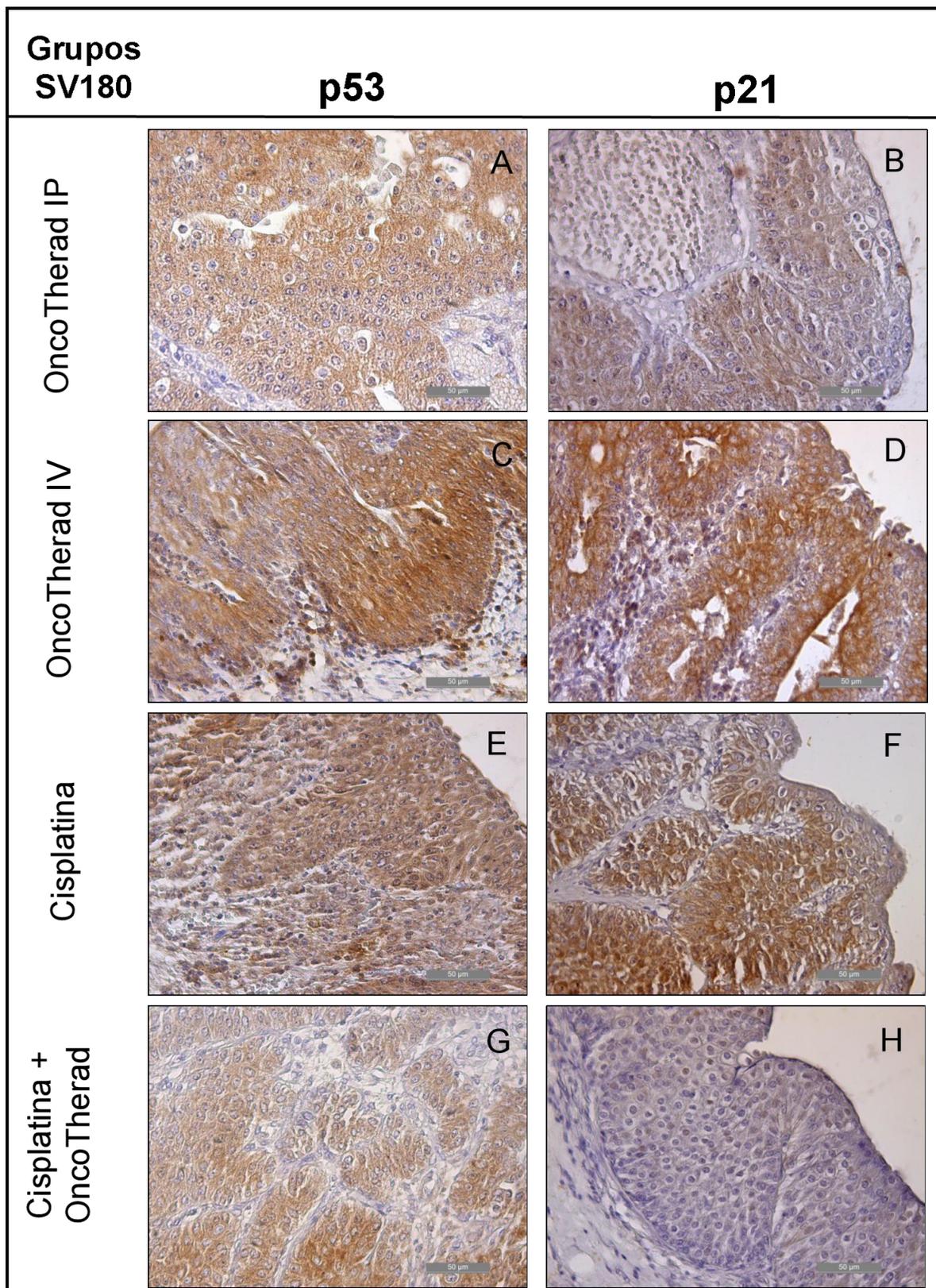


Figura 19. Imunomarcacão para os antígenos p53 e p21 na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

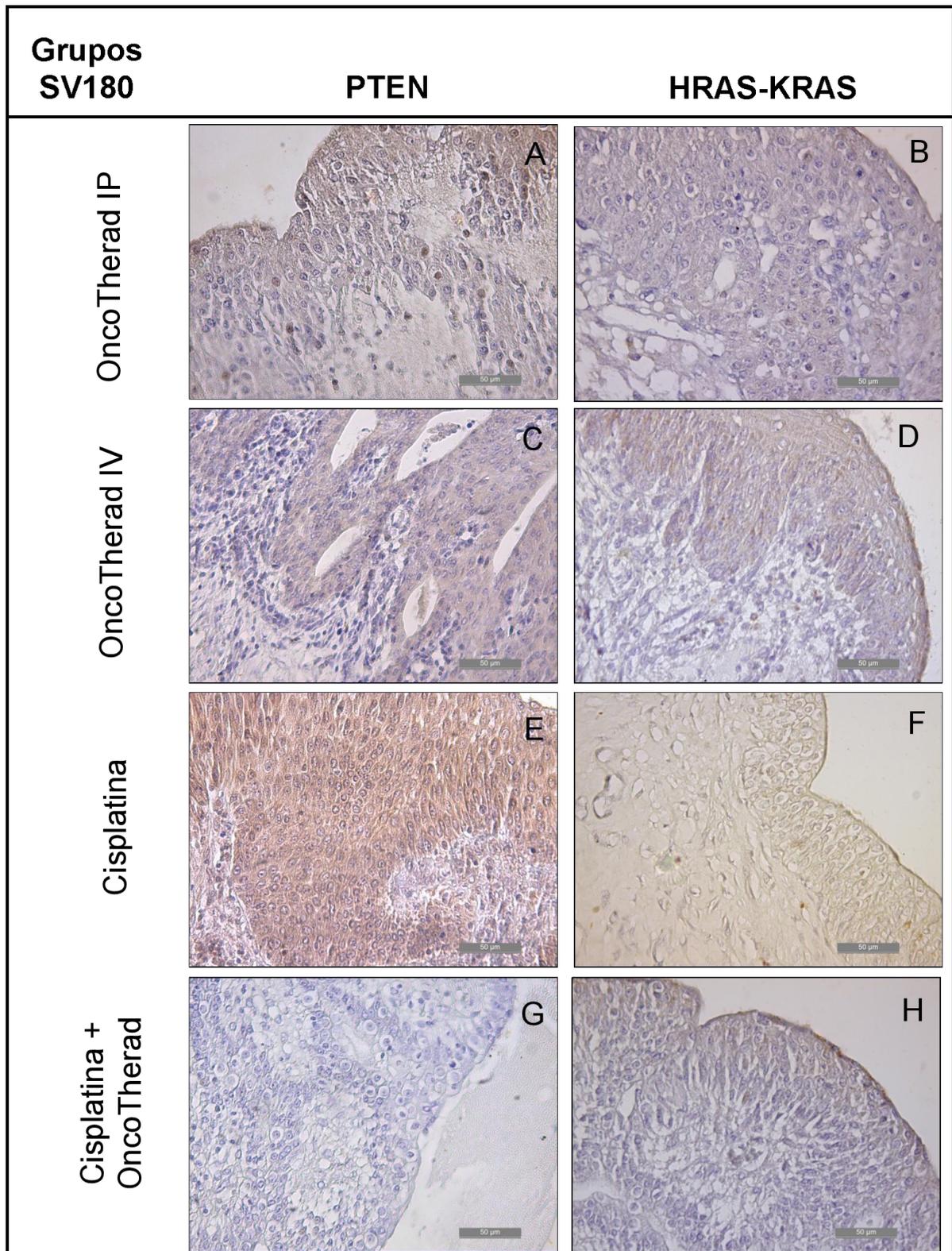


Figura 20. Imunomarcagem para os antígenos PTEN e HRAS-KRAS na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

A imunorreatividade para o antígeno Pi3K foi significativamente menor no grupo tratado com OncoTherad IP, comparado ao grupo tratado apenas com Cisplatina, entretanto não houve diferença estatisticamente significativa na imunorreatividade deste antígeno comparado aos demais grupos experimentais. Já a imunorreatividade para o antígeno mTOR foi menor no grupo tratado com OncoTherad IP e no grupo tratado com Cisplatina+OncoTherad, comparado ao grupo OncoTherad IV. No entanto o grupo tratado apenas com Cisplatina não apresentou diferenças estatisticamente significativas para a imunorreatividade do antígeno mTOR, comparado aos demais grupos experimentais SV180. A **Figura 21** ilustra a imunomarcção dos antígenos da via Pi3K/AKT/mTOR nos grupos SV180.

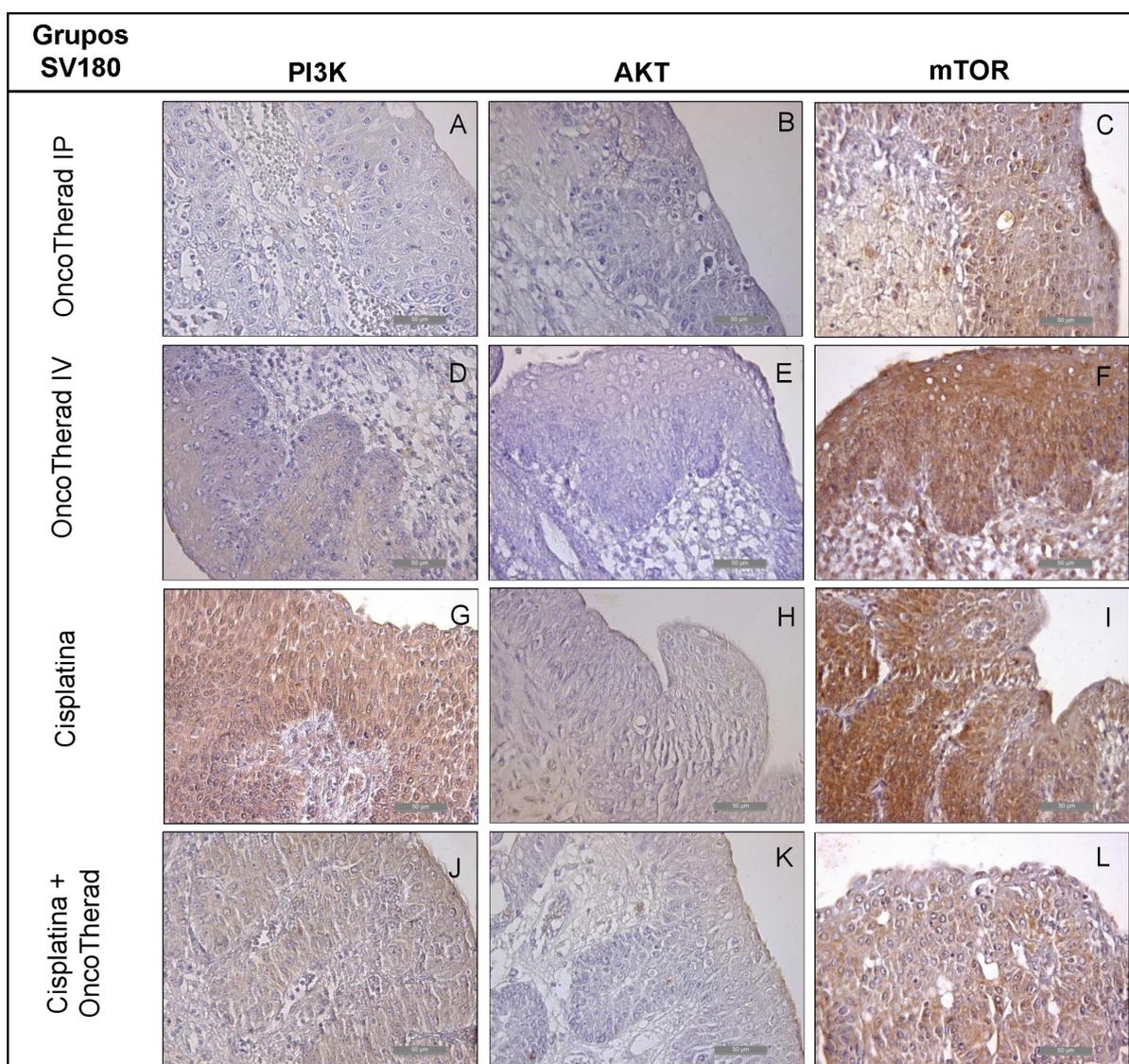


Figura 21. Imunomarcção para os antígenos PI3K, AKT e mTOR na bexiga urinária de animais dos grupos experimentais SV180. Grupos: Controle (A e B), MNU-Câncer (C e D), OncoTherad IP (E e F), OncoTherad IV (G e H) e Cisplatina (I e J). Revelação: DAB, Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

4.3.3 - Análise das Imunohistoquímicas de cada estratégia terapêutica em diferentes períodos experimentais

Afim de entender como as diferentes estratégias terapêuticas se relacionam com os marcadores analisados neste estudo, realizamos uma análise dos antígenos, comparando a mesma estratégia terapêutica, nos diferentes tempos de sobrevida. Para compreender e definir a efetividade antitumoral de cada modalidade de tratamento, iremos também comparar estes grupos experimentais, submetidos ao teste de sobrevida, com os grupos Controle (sadios) e MNU (Câncer). Com isso pretendemos constatar se, após longos períodos de sobrevida, os tratamentos continuam gerando a mesma resposta molecular e se a imunorreatividade destes antígenos analisados confirmam e explicam a inibição da progressão tumoral (IPT) nos diferentes grupos experimentais.

Cabe ressaltar ainda que a imunomarcção nos diferentes grupos experimentais foi heterogênea, sendo que para o mesmo antígeno observamos diferentes intensidades de imunorreatividade, classificada pelos scores (1, 2, 3 e 4) como muito fraca, fraca, moderada ou forte imunorreatividade. As **Figuras 22, 23 e 24** ilustram os gráficos dos scores da imunorreatividade para os antígenos analisados neste estudo.

- **OncoTherad IP - Redução na imunorreatividade do antígeno p53 em todos os grupos experimentais**

As análise das imunohistoquímicas dos grupos tratados com OncoTherad IP, demonstraram que houve uma diminuição significativa na imunorreatividade do antígeno p53, comparado ao grupo MNU (Câncer), em todos os grupos tratados com esta estratégia terapêutica. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com OncoTherad IP nos diferentes períodos de sobrevida, sendo que nos grupos experimentais que receberam este tratamento a imunorreatividade para p53 foi estatisticamente semelhante ao grupo Controle (sadios).

A imunorreatividade para o antígeno p21 foi significativamente maior nos animais eutanasiados logo após o tratamento com OncoTherad IP e naqueles

eutanasiados 90 dias após o término do tratamento (SV90), comparado ao grupo MNU (Câncer) e ao grupo eutanasiado 30 dias após o término do tratamento (SV30). Ainda, no grupo submetido ao maior tempo de sobrevivência, eutanasiados 180 dias após o término do tratamento (SV180), observou-se ainda uma diminuição significativa na imunorreatividade do antígeno p21, comparado ao grupo eutanasiado logo após o término do tratamento, no entanto a média da imunorreatividade para este antígeno neste grupo foi muito semelhante ao dos animais do grupo Controle (sadios).

Na análise da imunorreatividade do antígeno HRAS-KRAS, observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos experimentais tratados com OncoTherad IP, nos diferentes tempos de sobrevivência, comparado ao grupo MNU (Câncer). No entanto uma redução significativa na imunorreatividade do antígeno HRAS-KAS é vista nos animais do grupo OncoTherad IP SV90, comparado ao grupo SV30 submetido à um menor período de sobrevivência.

Não houve diferenças significativas na imunorreatividade do antígeno PTEN nos grupos tratados com OncoTherad IP, quando comparados ao grupo MNU (Câncer), no entanto, observamos que houve um aumento significativo na imunorreatividade deste antígeno nos grupos tratados com OncoTherad IP e submetidos ao teste de sobrevivência (SV30, SV90 e SV180), comparado ao grupo Controle (sadios).

A análise da imunorreatividade para o antígeno Pi3K não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais tratados com OncoTherad IP, nem quando comparado aos grupos Controle e MNU. Entretanto, nas análises do antígeno AKT constatou-se que houve um aumento significativo no grupo eutanasiados logo após o tratamento e no grupo OncoTherad IP SV30, comparado ao grupos MNU e OncoTherad IP SV180. A imunorreatividade para o antígeno mTOR não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com OncoTherad IP, comparados ao grupo MNU (Câncer). No entanto observou-se uma redução significativa na imunorreatividade deste antígeno no grupo OncoTherad SV90, quando comparado àqueles eutanasiados logo após o término do tratamento.

Os resultados das análises de imunohistoquímica dos grupos tratados com esta estratégia terapêutica são ilustrados na **Tabela 16**.

Tabela 16: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com OncoTherad IP.

Antígenos	Controle (n=5)	MNU (n=5)	OncoTherad IP			
			Pós-Tratamento (n=6)	SV30 (n=7)	SV90 (n=7)	SV180 (n=7)
p53	2 (37,4%)	3 (65,0%)	2 (48,7%)	2 (47,5%)	2 (48,3%)	3 (52,1%)
p21	3 (53,2%)	2 (41,3%)	4 (76,7%)	2 (49,8%)	3 (65,8%)	3 (53,9%)
Hras-Kras	2 (25,2%)	2 (39,2%)	2 (37,2%)	2 (44,4%)	2 (32,9%)	2 (35,7%)
PTEN	2 (26,7%)	2 (32,4%)	2 (41,6%)	2 (44,8%)	2 (45,1%)	2 (43,9%)
Pi3K	2 (31,9%)	2 (43,0%)	2 (43,9%)	3 (50,9%)	2 (42,8%)	2 (43,8%)
AKT	2 (33,5%)	2 (41,9%)	3 (55,0%)	3 (53,4%)	2 (46,5%)	2 (37,2%)
mTOR	2 (34,3%)	3 (57,5%)	3 (69,8%)	3 (64,6%)	3 (53,7%)	3 (56,9%)

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às medias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, Pi3K AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

• **OncoTherad IV - Aumento na imunorreatividade do antígeno p21 em todos os grupos experimentais com concomitante aumento do PTEN até 90 dias de sobrevida pós tratamento (SV90)**

A análise da imunorreatividade do antígeno p53 nos grupos experimentais tratados com OncoTherad IV, demonstraram que nos grupos eutanasiados logo após o tratamento, SV30 e SV90 houve uma diminuição significativa na imunorreatividade deste antígeno, comparado ao grupo MNU (Câncer). Enquanto que a imunorreatividade do antígeno p21 foi significativamente maior em todos os grupos tratados com OncoTherad IV, comparado ao grupo MNU. Observou-se ainda que no grupo eutanasiado logo após o término do tratamento, a imunorreatividade do antígeno p21 foi significativamente menor do que nos grupos SV30 e SV90.

O antígeno HRAS-KRAS teve sua imunorreatividade significativamente maior no grupo OncoTherad SV30 enquanto que uma diminuição significativa foi observada no

grupo OncoTherad SV90, comparado ao grupo MNU (Câncer). O grupo SV90 ainda apresentou diminuição estatisticamente significativa na imunorreatividade deste antígeno quando comparado aos grupos Pós-Tratamento (eutanasiados logo após o término do tratamento) e SV30. Também no grupo SV180 observou-se ainda uma diminuição significativa na imunorreatividade do HRAS-KRAS comparado ao grupo SV30.

Nas análises da imunorreatividade para o antígeno PTEN observamos que houve um aumento significativos nos grupos Pós-Tratamento, SV30 e SV90, comparado ao grupo MNU (Câncer). Enquanto que para o antígeno Pi3K, apenas o grupo SV90 apresentou aumento estatisticamente significativo, quando comparado as grupos MNU e Pós-Tratamento. Já o antígeno AKT teve sua imunorreatividade significativamente aumentada no grupo SV30, quando comparado aos grupos MNU, Pós-Tratamento e SV180. No entanto, comparado ao grupo MNU, apenas o grupo SV180 apresentou aumento significativo na imunorreatividade do antígeno mTOR.

Os resultados das análises de imunohistoquímica dos grupos tratados com esta estratégia terapêutica são ilustrados na **Tabela 17**.

Tabela 17: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com OncoTherad IV.

Antígenos	Controle (n=5)	MNU (n=5)	OncoTherad IV			
			Pós-Tratamento (n=6)	SV30 (n=7)	SV90 (n=7)	SV180 (n=4)
p53	2 (37,4%)	3 (65,0%)	3 (53,1%)	3 (50,4%)	3 (55,9%)	3 (61,9%)
p21	3 (53,2%)	2 (41,3%)	4 (78,0%)	3 (62,0%)	3 (64,4%)	4 (75,4%)
Hras-Kras	2 (25,2%)	2 (39,2%)	2 (45,7%)	3 (60,4%)	1 (25,0%)	2 (37,9%)
PTEN	2 (26,7%)	2 (32,4%)	3 (50,5%)	3 (51,0%)	3 (53,1%)	2 (45,3%)
Pi3K	2 (31,9%)	2 (43,0%)	2 (43,2%)	3 (53,4%)	3 (56,2%)	3 (50,1%)
AKT	2 (33,5%)	2 (41,9%)	2 (45,5%)	3 (66,3%)	3 (54,1%)	2 (45,6%)
mTOR	2 (34,3%)	3 (57,5%)	3 (68,0%)	3 (69,4%)	3 (65,2%)	4 (78,2%)

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às medias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, Pi3K, AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

- **Cisplatina - Redução da imunorreatividade do antígeno p53 no grupo submetido ao teste de sobrevivência SV90 promovendo maior índice IPT nesta modalidade terapêutica**

Nas análises das imunohistoquímicas dos grupos tratados apenas com Cisplatina, notou-se que houve redução estatisticamente significativa na imunorreatividade do antígeno p53 no grupo eutanasiado 90 dias após o término do tratamento (SV90), comparado ao grupo MNU e aos demais grupos tratados com este fármaco. Enquanto que a imunorreatividade do antígeno p21 foi estatisticamente maior nos grupos SV30 e SV180, comparado ao grupo MNU (Câncer). Ainda para o antígeno p21 observou-se um aumento significativo na imunorreatividade desta proteína no grupo SV180, comparado ao grupo SV90 submetido a um menor período de sobrevivência.

As análises da imunorreatividade do antígeno PTEN nos grupos tratados com Cisplatina demonstraram que houve um aumento significativo nos grupos Pós-Tratamento, SV30 e SV180 quando comparados ao grupo MNU (Câncer). Já nas análises do antígeno Pi3K, observamos que houve um aumento estatisticamente significativo no grupo SV30, comparado aos grupos MNU e SV90. A imunorreatividade para o antígeno Pi3K também esteve estatisticamente maior no grupo SV180 quando comparado ao grupo SV90. No entanto, não houve diferenças significativas na imunorreatividade dos antígenos HRAS-KRAS, AKT e mTOR entre os grupos tratados com Cisplatina, nem quando comparados ao grupo MNU (Câncer).

Os resultados das análises de imunohistoquímica dos grupos tratados com esta estratégia terapêutica são ilustrados na **Tabela 18**.

Tabela 18: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com Cisplatina.

Antígenos	Controle (n=5)	MNU (n=5)	Cisplatina			
			Pós-Tratamento (n=5)	SV30 (n=7)	SV90 (n=7)	SV180 (n=6)
p53	2 (37,4%)	3 (65,0%)	3 (65,8%)	3 (61,0%)	2 (41,2%)	3 (56,2%)
p21	3 (53,2%)	2 (41,3%)	3 (61,5%)	3 (64,4%)	3 (53,1%)	3 (69,0%)
Hras-Kras	2 (25,2%)	2 (39,2%)	2 (40,3%)	2 (44,3%)	2 (40,3%)	2 (37,6%)
PTEN	2 (26,7%)	2 (32,4%)	3 (55,3%)	3 (51,9%)	2 (41,8%)	3 (52,4%)
Pi3K	2 (31,9%)	2 (43,0%)	3 (52,0%)	3 (61,7%)	2 (42,3%)	3 (57,7%)
AKT	2 (33,5%)	2 (41,9%)	2 (37,9%)	2 (41,4%)	2 (28,9%)	2 (39,0%)
mTOR	2 (34,3%)	3 (57,5%)	3 (60,9%)	3 (64,2%)	3 (55,0%)	3 (67,9%)

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às medias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN, Pi3K: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

• Cisplatina+OncoTherad - Aumento na imunorreatividade do antígeno p21 nos grupos em que houve Inibição da Progressão Tumoral

Nas análises das imunohistoquímicas dos grupos experimentais tratados com Cisplatina+OncoTherad (SV30, SV90 e SV180) notou-se que, comparado ao grupo MNU (Câncer), houve aumento estatisticamente significativo do antígeno p53 em todos os grupos que receberam esta estratégia terapêutica. Enquanto que a imunorreatividade do antígeno p21 nos grupos SV30 e SV90 foi significativamente maior quando comparado aos grupos MNU e SV180.

Na imunorreatividade para o antígeno HRAS-KRAS observou-se uma redução significativa no grupo SV90, comparado ao grupo MNU e SV30. Ainda para a imunorreatividade deste antígeno, uma redução estatisticamente significativa também foi vista no grupo SV180 quando comparado ao grupo SV30. Já o antígeno

PTEN teve sua imunorreatividade significativamente aumentada apenas no grupo SV30, comparado ao grupo MNU (Câncer).

Nas análises da imunorreatividade do antígeno Pi3K um aumento estatisticamente significativo foi observado no grupo SV30 quando comparado com os grupos MNU (Câncer) e SV90. Enquanto que na imunorreatividade do antígeno AKT o que observamos foi uma diminuição significativa no grupo SV180, comparado aos grupos MNU e SV30. Ainda para este antígeno, uma diminuição estatisticamente também foi observada no grupo SV90, quando comparado ao grupo SV30.

Contudo, assim como no grupo tratado apenas com Cisplatina, não houve diferenças significativas na imunorreatividade dos antígenos HRAS-KRAS, AKT e mTOR entre os grupos tratados com Cisplatina+OncoTherad, nem quando comparados ao grupo MNU (Câncer). Os resultados das análises de imunohistoquímica dos grupos tratados com esta estratégia terapêutica são ilustrados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Porcentagem de imunorreatividade dos diferentes antígenos nas bexigas urinárias de ratas Fisher 344 dos grupos experimentais: Controle, MNU (Câncer) e tratados com Cisplatina+OncoTherad.

Antígenos	Controle (n=5)	MNU (n=5)	Cisplatina+OncoTherad		
			SV30 (n=7)	SV90 (n=7)	SV180 (n=2)
p53	2 (37,4%)	3 (65,0%)	2 (46,9%)	2 (44,2%)	3 (52,5%)
p21	3 (53,2%)	2 (41,3%)	3 (57,9%)	3 (70,5%)	2 (47,7%)
Hras-Kras	2 (25,2%)	2 (39,2%)	2 (47,6%)	2 (29,2%)	2 (33,1%)
PTEN	2 (26,7%)	2 (32,4%)	3 (50,3%)	2 (47,0%)	2 (42,3%)
Pi3K	2 (31,9%)	2 (43,0%)	3 (62,9%)	2 (45,0%)	2 (48,8%)
AKT	2 (33,5%)	2 (41,9%)	2 (49,4%)	2 (35,0%)	2 (29,8%)
mTOR	2 (34,3%)	3 (57,5%)	3 (68,1%)	3 (71,1%)	3 (56,9%)

Scores (1, 2, 3 e 4) correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte). Valores entre parênteses equivalem às medias da porcentagem de células uroteliais positivas para os antígenos por grupo (n=15 secções/grupo). p53, p21, Hras-Kras, Pi3K, AKT, mTOR: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. PTEN: ANOVA, Teste de Tukey. Na mesma linha, valores seguidos por letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

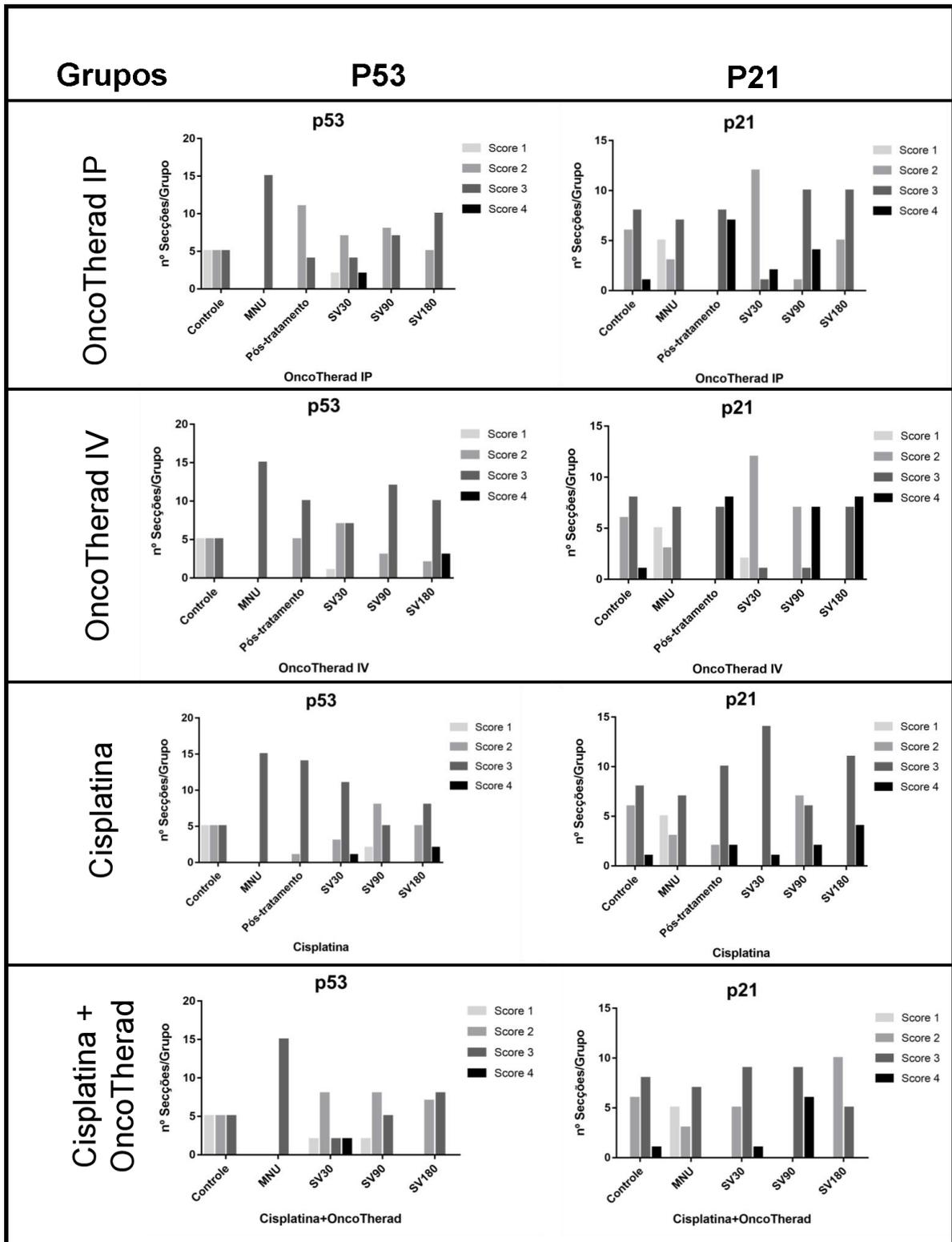


Figura 22. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários p53 e p21 nos diferentes grupos experimentais. Scores correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte).

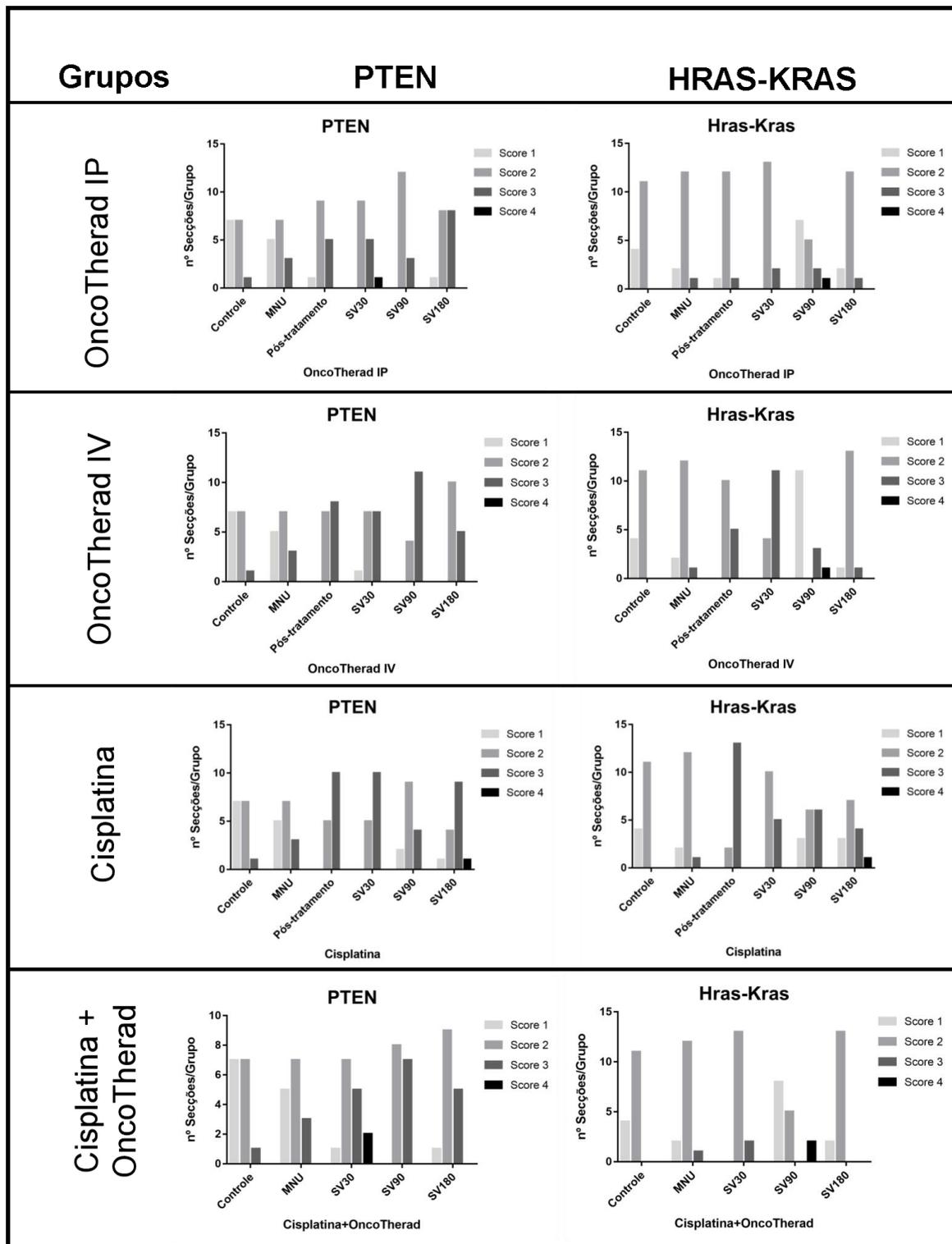


Figura 23. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários PTEN e HRAS-KRAS nos diferentes grupos experimentais. Scores correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte).

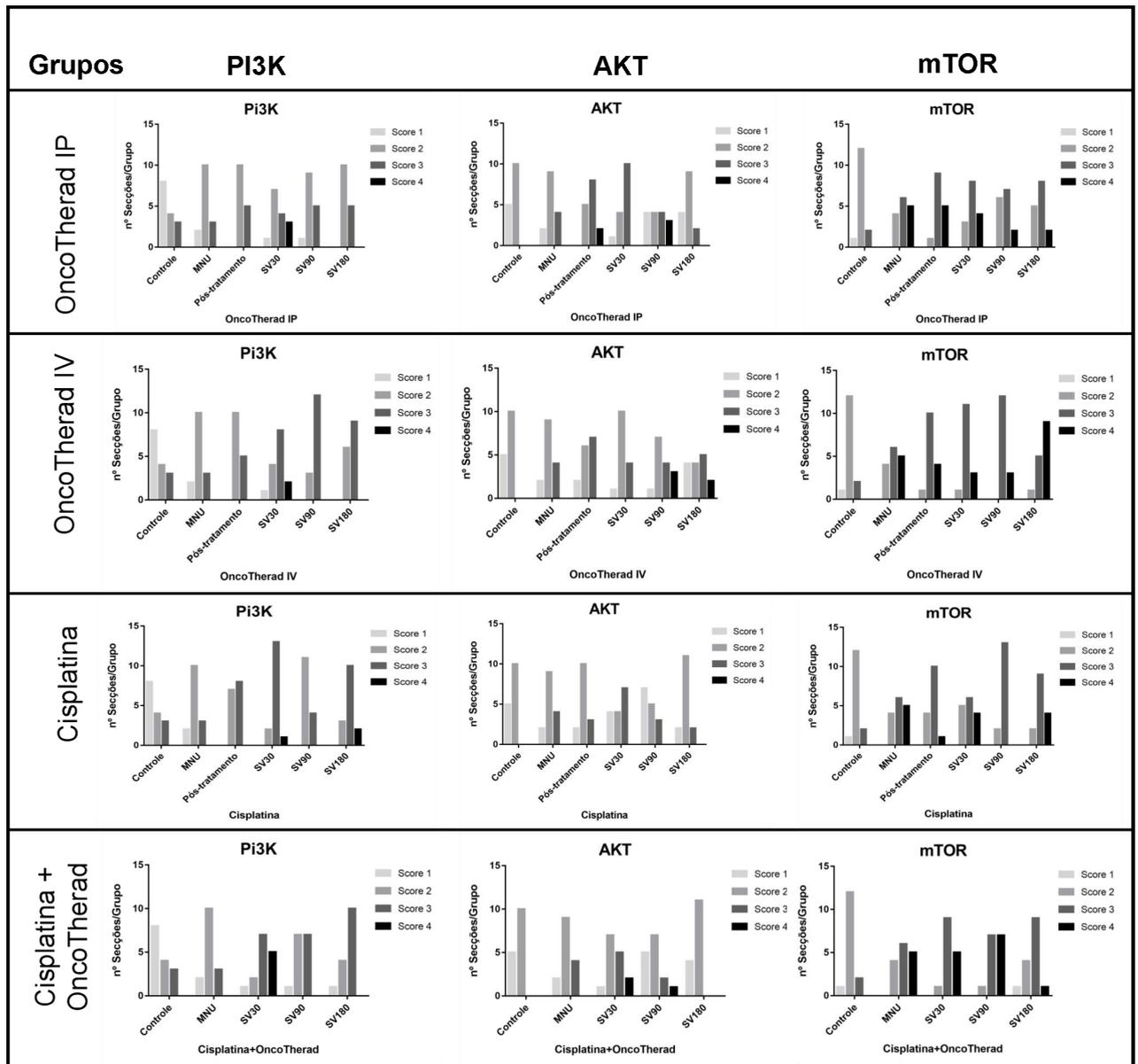


Figura 24. Gráficos dos Scores da imunorreatividade dos anticorpos primários Pi3K, AKT e mTOR nos diferentes grupos experimentais. Scores correspondem à intensidade de imunorreatividade por proteína para cada grupo (1=muito fraca, 2=fraca, 3=moderada e 4=forte).

5 – DISCUSSÃO

O câncer vesical, caracterizado por lesões superficiais (CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva e progressão tumoral. Comparado a outros tipos de câncer, os pacientes com CBNMI apresentam uma taxa de sobrevida considerada alta, no entanto a característica recidivante e progressiva do CB reduz a qualidade de vida destes doentes.

A imunoterapia com BCG é a terapia intravesical mais usada para a profilaxia da recorrência e progressão do CBNMI e é considerada um dos métodos mais eficazes dentre os protocolos usuais. No entanto, o uso de BCG é limitado no CBNMI por falha do tratamento, efeitos adversos e intolerância que ocorrem em mais de dois terços de todos os pacientes (Packiam et al., 2017). A incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos é significativamente reduzida com a utilização de agentes quimioterápicos. No entanto, a resposta à quimioterapia intravesical é incompleta e a recorrência tumoral é elevada (superior a 80%) em pacientes com doença não-músculo invasiva.

Sendo assim, o tratamento do CBNMI continua sendo um desafio, uma vez que a recorrência e progressão da doença, bem como os efeitos colaterais associados às modalidades terapêuticas disponíveis, ainda estão presentes (Malmström, 2017). Diante deste cenário, o desenvolvimento de novas terapias ou associações antitumorais para o tratamento do CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas, são muito relevantes. Neste contexto, a associação de modalidades terapêuticas já vem sendo proposta para o tratamento de diversos tipos de carcinoma, com o objetivo de aumentar a eficiência antitumoral e minimizar os efeitos adversos, gerando uma resposta mais completa. A Cisplatina é um quimioterápico que age como um antineoplásico e tem uma gama grande de atividades, podendo ser administrada sozinha ou com outras drogas, amplificando seu efeito (Chuffa et al., 2018). Estudos realizados em ratos induzidos quimicamente ao CBNMI demonstraram que a associação entre a imunoterapia intravesical com P-MAPA e a quimioterapia com Cisplatina promoveram a diminuição da proliferação de células tumorais uroteliais (Dias et al., 2016).

Desta forma, este estudo foi dividido em duas partes, no primeiro momento analisamos a Inibição da progressão tumoral (IPT) promovida pelos tratamentos baseados no uso dos fármacos isolados OncoTherad (IP e IV) e Cisplatina, e posteriormente fizemos uma análise da sobrevida pós-tratamento incluindo grupos experimentais que foram tratados com a associação da imunoterapia com OncoTherad e quimioterapia com Cisplatina.

A estrutura e função do trato urinário inferior de roedores são semelhantes à dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CBNMI, o que faz dos roedores um excelente modelo experimental para o CB (Williams et al., 2008). Nossos resultados demonstraram que o MNU foi efetivo na indução do CBNMI nesse modelo animal, uma vez que 100% dos animais tratados apenas com MNU apresentaram tumor indiferenciado, como carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1) e carcinoma papilífero (pTa). O carcinógeno ENU, indicado para substituição do anterior também se mostrou efetivo para a indução do CBNMI em ratos, induzindo a formação de carcinoma papilífero (pTa) em 100% dos animais.

Neste trabalho, quando analisamos o IPT Pós-Tratamento dos fármacos (isolados) OncoTherad e Cisplatina, nossos resultados demonstraram que, dentre as diferentes estratégias terapêuticas testadas, a imunoterapia com OncoTherad promove IPT (Inibição da Progressão Tumoral) superior à quimioterapia com Cisplatina. O tratamento com OncoTherad promoveu regressão tumoral em ambas as vias de administração, quando tratados com via intravesical (50,0%) ou via intraperitoneal (33,3%). No entanto, embora a literatura descreva a eficiência da Cisplatina no tratamento de tumores vesicais, nossos resultados demonstraram que este quimioterápico não foi capaz de promover inibição da progressão tumoral nos animais experimentais eutanasiados logo após o término do tratamento. Uma hipótese seria que este quimioterápico possa ter um mecanismo de ação mais lento, sendo necessário um tempo maior de exposição ao fármaco para demonstrar seu efeito antitumoral, o que reforça a relevância do estudo da sobrevida pós-tratamento.

A descoberta e desenvolvimento de medicamentos, como o OncoTherad, é um empreendimento de alto risco e de longo prazo de maturação que exige a participação de muitos grupos e instituições de pesquisa para ser bem-sucedido.

Este processo pode ser auxiliado ou facilitado, pela eventual existência de um ambiente social e econômico que seja estimulador da criação de produtos de base tecnológica, retribuindo a novidade ou utilidade criada.

Neste estudo, a resposta gerada pelo OncoTherad caracterizou-se pelo aumento de infiltrado de células inflamatórias no urotélio dos animais e bons índices de Inibição da Progressão Tumoral (IPT). As análises histopatológicas pós-tratamento demonstraram que este fármaco se mostrou mais efetivo do que a Cisplatina, nos levando a concluir que o uso do OncoTherad representa uma alternativa terapêutica eficaz para o tratamento do CBNMI. Ainda, em um estudo recente Durán et al. (2019) avaliaram o IPT em ratos induzidos quimicamente ao CBNMI pós-tratamento com BCG e demonstraram que o tratamento com BCG foi capaz de induzir a inibição da progressão tumoral em apenas 20% dos animais. Nossos resultados, obtidos a partir do mesmo modelo experimental, comprovam que o OncoTherad se mostra mais efetivo do que o BCG no tratamento do CBNMI em ratos.

Atualmente, os avanços do nosso grupo de pesquisa já podem posicionar este fármaco como uma promissora estratégia terapêutica para o tratamento do CBNMI. O OncoTherad teve sua segurança e eficácia comprovada em testes com roedores e vem sendo administrado em pacientes humanos com câncer de bexiga recidivante, quando todas as alternativas de tratamento foram esgotadas, com excelentes resultados e mínimos efeitos colaterais. Em seres humanos foi realizado um estudo monocêntrico fase I/ II, braço único em 15 pacientes (10 homens, 5 mulheres) com mediana da idade de 71 anos. A taxa de sobrevida livre de recidiva (SLR) em 18 meses foi de 86,7% (Fávaro et al., 2019). Em cães, o OncoTherad foi capaz de diminuir a expressão do sistema RANK/RANKL e, conseqüentemente impedir a formação de metástases e/ ou impedir a progressão das mesmas (Fávaro et al., 2019). Assim, nossa contribuição para o desenvolvimento do OncoTherad é identificar os possíveis mecanismos de ação e seus efeitos biológicos e moleculares no tratamento e principalmente na sobrevida pós-tratamento do paciente com CB.

Embora o efeito antitumoral pós tratamento tenha sido classificado na primeira parte deste estudo, é de extrema importância caracterizar a sobrevida pós tratamento destes animais, considerando a característica recidivante do CBNMI e as altas taxas de toxicidade envolvendo as estratégias terapêuticas usuais para o

tratamento desta neoplasia. O principal objetivo do Teste de sobrevivência e regressão/progressão tumoral pós-tratamento, foi analisar e comparar a sobrevivência dos animais submetidos às diferentes estratégias terapêuticas, considerando fatores que refletem a qualidade de vida do animal doente, tais como ganho/perda de peso corporal, consumo de água e ração, outras alterações no trato urinário (presença de cálculos vesicais/renais e hidroureter), a regressão/progressão do tumor vesical, e o tempo de vida dos animais.

Segundo Consenso nacional de nutrição oncológica/Instituto Nacional de Câncer (CNNO/INCA 2009), a perda de peso e a desnutrição são os distúrbios nutricionais frequentemente observados em pacientes com câncer (40% a 80% dos casos), sendo que até 30% dos pacientes adultos apresentam perda superior a 10% do peso, sendo que os principais fatores determinantes da desnutrição nesses indivíduos são a redução na ingestão total de alimentos, as alterações metabólicas provocadas pelo tumor e o aumento da demanda calórica pelo crescimento do tumor. Nossos resultados demonstram que não houve perda de peso nos animais experimentais no período de indução, entretanto evidenciaram que houve redução no ganho de peso/semanal e no consumo de ração no período de indução do CBNMI com MNU, porém um aumento nestes dois parâmetros ocorre com o tratamento com os fármacos (isolados) OncoTherad e Cisplatina.

Pacientes em tratamento antitumoral apresentam vários sinais e sintomas que levam à diminuição da ingestão diária de nutrientes que comprometem o estado nutricional. Durante o tratamento antitumoral, os pacientes oncológicos podem evoluir para desnutrição moderada ou grave e, cerca de 20% desses pacientes, morrem em decorrência da desnutrição e não da doença maligna (Ottery, 1994). A desnutrição leva ao aumento da morbimortalidade e da toxicidade causada pela estratégia terapêutica usada, resultando em aumento no tempo de internação e dos custos hospitalares. Tudo isso prejudica a condição geral do paciente e sua qualidade de vida (Senesse et al., 2008).

Nossos resultados mostraram que as diferentes estratégias terapêuticas testadas não promoveram perda de peso corporal significativa nos animais experimentais que, pelo contrário, no final do procedimento apresentaram ainda ganho de peso, comparado ao peso inicial. Esses resultados nos permitem concluir

que o tratamento para o CBNMI utilizando a imunoterapia com OncoTherad e/ou a Cisplatina já possuem uma grande vantagem em garantir uma sobrevida melhor ao doente, uma vez que a perda de peso e a desnutrição pode ser uma barreira para o sucesso do tratamento oncológico e ainda promover diversas alterações fisiológicas e funcionais que comprometam a qualidade de vida do paciente com câncer.

As alterações morfológicas e funcionais causadas pela desnutrição no paciente com câncer são diversas. No pulmão, por exemplo, podem surgir atelectasias e pneumonias decorrentes da redução da massa muscular diafragmática e da redução dos níveis de concentração de lecitina nos alvéolos pulmonares em pacientes desnutridos. A desnutrição também modifica a morfologia hepática, provoca edema e atrofia dos hepatócitos, esteatose hepática, degeneração mitocondrial e dos microsossomos, e compromete as funções hepáticas, restringindo a capacidade de depuração de fármacos e a síntese de albumina e peptídeos. A desnutrição pode, ainda, afetar as funções gastrointestinais, provocando síndrome de má-absorção, translocação intestinal de micro-organismos, hipocloridria por diminuição das enzimas intestinais, perda de gordura e adelgaçamento da parede intestinal, atrofia das mucosas gástrica e intestinal, diminuição das microvilosidades e diminuição da massa celular do tecido linfático associado ao intestino (Moreira & Waitzberg, 2000).

Além disso, o sistema imune também fica prejudicado no paciente desnutrido, devido à diminuição na produção de imunoglobulinas, redução na atividade do sistema complemento, do número de linfócitos T e CD4, no arrefecimento do poder bactericida dos neutrófilos, o qual propicia o aumento da suscetibilidade às infecções de feridas, sépsis abdominal e pneumonia pós-operatória (Moreira & Waitzberg, 2000). Consequentemente, a desnutrição pode contribuir para a ocorrência de complicações no período pós-operatório, colaborando para o aumento do tempo de internação, comprometendo a qualidade de vida e tornando o tratamento mais oneroso (CNNO/INCA 2009).

Outra observação feita neste estudo foi o aumento significativo no consumo de água nos animais experimentais que receberam tratamento intravesical com OncoTherad (grupos OncoTherad IV e Cisplatina+OncoTherad). Sabemos que a hidratação é de extrema importância no tratamento do câncer, uma vez que a água

é um importante soluto, pois ajuda a diluir as toxinas do organismo, transportando-as até os rins para a sua eliminação. No entanto, a relação entre o tratamento intravesical e o aumento (inconsciente, como é o caso dos nossos animais) no consumo de água ainda é pouco explorado.

A qualidade de vida pós tratamento, neste estudo, também é analisada a partir das alterações macroscópicas no trato urinário destes animais. Observamos a ocorrência de cálculos vesicais e/ou renais e também a presença de hidroureter nos animais tratados, pois acreditamos que tais alterações podem contribuir para o desconforto e, conseqüentemente, comprometer a qualidade de vida dos mesmos.

O tratamento OncoTherad IP não promoveu a formação de cálculos renais e a presença de cálculos vesicais tornou-se menos frequente período de sobrevivência, entretanto, a presença de hidroureter foi mais frequente neste grupo experimental. Contrariamente, quando tratados com o mesmo composto na via intravesical notamos que as alterações macroscópicas se tornavam mais frequentes quanto maior era o período de sobrevivência. Já nos animais tratados apenas com Cisplatina notamos que as alterações macroscópicas do trato urinário tornaram-se menos frequentes nos primeiros períodos de sobrevivência, sendo que em SV30 essas alterações eram ausentes, no entanto, após 6 meses de tratamento observamos a presença de hidroureter na frequência de 33,33%. A associação de OncoTherad com Cisplatina também promoveu a formação de cálculos vesicais e presença de hidroureter nos animais submetidos ao teste de sobrevivência, sendo que os maiores índices foram vistos 3 meses após o final do tratamento, no entanto, após 6 meses não observamos essas alterações nos animais experimentais deste grupo.

Contudo, as alterações macroscópicas no trato urinário dos animais experimentais foram vistas em todas as estratégias terapêuticas testadas neste trabalho de forma aleatória e, diferente do que se esperava, não observou-se uma relação entre a frequência destas alterações e o diagnóstico histopatológico final, o que nos leva a concluir que o aumento destas alterações não se relacionam com um pior diagnóstico do CB.

Tais alterações macroscópicas não foram observadas no trato urinário dos animais controles (animais saudáveis ou quimicamente induzidos ao CBNMI, sem tratamento) utilizados no início deste estudo, evidenciando que tais alterações eram

decorrentes da evolução da carcinogênese e/ou dos efeitos adversos causados pelas estratégias terapêuticas testadas neste trabalho. Neste momento é importante salientar que independente da via de administração do fármaco (intravesical ou intraperitoneal) essas alterações no trato urinário dos animais são vistas, exceto em relação à formação de cálculo renal que foi ausente nos animais tratados apenas via intraperitoneal, seja com OncoTherad ou com Cisplatina. No entanto é difícil prever quais destas alterações causam maiores desconfortos nos animais, sendo necessário um estudo mais aprofundado que caracterize o efeito e o impacto destas na qualidade de vida do doente com CB.

Devido à elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (Askeland et al., 2012), os principais objetivos no tratamento de pacientes com CBNMI são prevenir o alto número de recorrências e prevenir a progressão tumoral na sobrevida dos pacientes que sofrem desta neoplasia. Neste estudo, os índices de Inibição da Progressão Tumoral (IPT) foram definidos a partir das análises histopatológicas das bexigas urinárias dos animais, sendo representado pela percentagem de lesões não-malígnas presente em cada grupo após o procedimento experimental, uma vez provado que o modelo de indução ao CBNMI com MNU promove 100% de lesões malígnas (pTis, pTa ou pT1) na bexiga urinária dos animais. Quando submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral SV30 (1 mês após o final do tratamento), os índices de IPT dos animais tratados com o OncoTherad foram maiores, 42,84% (via intraperitoneal) e 57,14% (via intravesical), comparado àqueles eutanasiados logo após o término do tratamento. Estes resultados nos permitem concluir que esta imunoterapia continua gerando resposta após seu término. O Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral também nos mostrou que o tratamento com Cisplatina teve seu índice de IPT elevado após o término do tratamento, que foi de zero (nos animais eutanasiados logo após o tratamento) para 14,28% (nos animais eutanasiados 30 dias após o final do tratamento).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a combinação da imunoterapia intravesical com P-MAPA e Cisplatina sistêmica no modelo animal com CBNMI foi eficaz, bem tolerada e não mostrou sinais aparentes de antagonismo entre as drogas (Dias et al., 2016). Neste trabalho, verificamos que a

associação do OncoTherad intravesical com a Cisplatina mostrou um índice de IPT de 28,57% nos animais SV30, demonstrando novamente que a associação das duas estratégias terapêuticas (imunoterapia e quimioterapia) foi efetiva, além de se mostrar capaz de promover regressão tumoral superior ao tratamento feito apenas com Cisplatina em SV30.

Quando submetidos à um tempo maior de sobrevida, 3 meses pós tratamento (SV90), os índices de IPT foram ainda maiores nos animais do Grupo OncoTherad IP (71,43%), Cisplatina (57,14%) e Cisplatina+OncoTherad (57,14%). No entanto houve diminuição no índice de IPT dos animais tratados com OncoTherad IV (42,84%). Contudo, comparado ao grupo MNU, todas as estratégias terapêuticas testadas promoveram IPT estatisticamente significativo em SV90. Considerando a característica recidivante do CBNMI, podemos concluir aqui que as estratégias terapêuticas testadas, em sua maioria, obtiveram aumento crescente no índice de IPT, impedindo a recidiva e a progressão tumoral na maioria dos grupos submetidos ao teste de sobrevida - 3 meses pós-tratamento.

Analisando o IPT nos diferentes períodos de sobrevida, podemos inferir que a imunoterapia com OncoTherad intravesical no período pós-tratamento foi mais efetiva, gerando uma resposta mais rápida e maiores IPT nesse período. Entretanto, de acordo com nossos resultados, o tratamento intraperitoneal (sistêmico) tende a ser mais efetivo na sobrevida pós-tratamento. Sendo assim, pode-se pensar na hipótese de alternar os tipos de estratégias terapêuticas, considerando em que momento determinada estratégia é mais vantajosa.

Nos grupos experimentais submetidos ao teste de sobrevida 6 meses pós-tratamento (SV180), observamos que 100% dos animais apresentavam lesões malignas no seu trato urinário além de elevadas taxas de mortalidade em quase todas as estratégias realizadas. No entanto dois pontos devem ser considerados na análise deste teste: 1) a descontinuidade do carcinógeno MNU, e a substituição deste pelo ENU que promoveu a ocorrência de carcinoma papilífero sem invasão de lâmina própria (pTa) em todos os animais induzidos; e 2) a necessidade de analisar e comparar a taxa de mortalidade das diferentes estratégias terapêuticas, visto que o período experimental era muito longo para o animal doente. Portanto, considerando a indução ao CBNMI com ENU, nestes grupos podemos considerar também um

índice de inibição da progressão tumoral (IPT*), uma vez que alguns destes animais não evoluíram para um diagnóstico pior do que aquele inicial (pTa). Sendo assim, os índices IPT* nos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral - após 6 meses de tratamento seriam de 42,9% nos animais tratados com OncoTherad IP, 25,0% nos animais tratados com o mesmo composto na via intravesical (OncoTherad IV) e 50,0% nos animais tratados apenas com Cisplatina. Nos animais do Grupo Cisplatina+OncoTherad esse índice foi zero.

Contudo, através das análises histopatológicas, observamos que até SV90 o tratamento com Cisplatina promove índices de IPT inferiores àqueles resultantes do tratamento com o OncoTherad (IP ou IV). No período de sobrevida mais longo (SV180) o IPT do grupo Cisplatina foi superior (em %) aos grupos tratados OncoTherad, no entanto devido à eventuais mortalidades nos animais, com o aumento do período experimental, é importante salientar que o 'n' de animais que apresentaram IPT foi o mesmo nos animais tratados com Cisplatina ou OncoTherad IP. Desta forma, analisando os resultados em conjunto, podemos concluir que o OncoTherad se mostrou mais efetivo do que a Cisplatina no tratamento de ratos com CBNMI quimicamente induzido.

O tempo de vida dos animais é um outro fator considerado neste estudo para caracterizar a sobrevida destes animais. Neste trabalho a taxa de sobrevida foi calculada à partir da taxa de mortalidade dos animais tratados, e refere-se à percentagem de animais que sobreviveram até o final do procedimento experimental (SV30, SV90 e SV180), ou seja, em uma estratégia terapêutica onde a taxa de mortalidade é zero, a taxa de sobrevida é 100%, no entanto, se a taxa de mortalidade for 25% conseqüentemente a taxa de sobrevida será 75%. Sendo assim, pode-se dizer que a Taxa de Mortalidade + Taxa de Sobrevida = 100%.

De acordo com nossos resultados, a maior taxa de mortalidade (75,00%) ocorre no grupo tratado com Cisplatina+OncoTherad. A mortalidade nos animais tratados apenas com uma estratégia terapêutica foi menor, sendo que no grupo tratado apenas com OncoTherad IV foi de 50,0% e quando tratados apenas com Cisplatina a taxa de mortalidade foi de 25,0%. A menor mortalidade foi vista no grupo tratado com OncoTherad na via intraperitoneal, nesses animais a taxa de mortalidade, 6 meses após o término do tratamento, foi de apenas 12,5%. Diante

desse resultados, uma relação pode ser feita entre a taxa de mortalidade e o índice de IPT*, uma vez que os tratamentos que possuem os maiores IPT* (Grupos OncoTherad IP e Cisplatina) são também os que possuem menores taxas de mortalidade.

Atualmente, a taxa de sobrevida é utilizada pelos clínicos como uma forma de auxiliar na discussão do prognóstico de um paciente. As taxas de sobrevida relativa são uma maneira mais precisa de estimar o efeito do câncer na sobrevida, tais taxas comparam os pacientes com CB com as pessoas da população em geral. Por exemplo, se a taxa de sobrevida relativa em 5 anos para um estágio específico de câncer de bexiga é de 90%, isso significa que as pessoas que têm esse câncer são, em média, cerca de 90% mais propensas, do que aquelas que não têm esse câncer, à viver por pelo menos 5 anos após ser diagnosticado. Em outras palavras, as taxas de sobrevida podem lhe dar uma idéia de que percentagem de pessoas com o mesmo tipo e estágio de câncer ainda estão vivas por um determinado período de tempo (geralmente 5 anos) depois de terem sido diagnosticadas. De acordo com os dados mais recentes, baseado em pessoas diagnosticadas com câncer de bexiga entre 2008 e 2014, quando se incluem todos os estágios do CB, a taxa de sobrevida relativa em 5 anos é de 77%, em 10 anos é de 70% e em 15 anos cai para 65% (American Cancer Society, 2018).

Quando utilizamos animais como modelos de doenças humanas, alguns fatores precisam ser analisados para que seja possível fazer uma correlação entre a pesquisa experimental e sua projeção na saúde humana. A relação da idade do rato com a idade humana tem sido um fator bastante explorado, uma vez que esses animais são os mais utilizados na pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o CB, no entanto o número de publicações existentes enfocando e aprofundando o assunto é muito escasso.

Os ratos da Linhagem Fischer 344, utilizados neste trabalho, são um modelo de rato isogênico (*inbred*) amplamente utilizado em pesquisa do câncer, toxicologia e estudos de longevidade. Ratos desta linhagem são considerados adultos com 10 semanas de idade.

Comparados aos seres humanos, os ratos têm infância breve e acelerada. Desenvolvem-se rapidamente durante a infância e tornam-se sexualmente maduros

com cerca de seis semanas de idade. Seres humanos, por outro lado, desenvolvem-se lentamente e não atingem a puberdade até a idade de 12 a 13 anos. A adolescência e juventude do rato é menos acelerada (10,5 dias no rato = 1 ano no humano), e na idade adulta cada mês do rato é aproximadamente equivalente a 2,5 anos humanos (Andreollo et al., 2012).

Sendo assim, conhecendo a correlação do tempo de vida dos ratos com os humanos, podemos inferir também que neste estudo os intervalos nas doses de manutenção realizadas no período de sobrevida representam um longo período (30 dias do rato = 2,5 anos do humano), o que nos leva a acreditar que uma diminuição neste intervalo, tornando-o mais similar ao esquema de manutenção que é realizado nos pacientes humanos, pode ainda aumentar a efetividade antitumoral das estratégias terapêuticas testadas neste trabalho.

Ainda, considerando que cada ano do rato adulto equivale à 2,5 anos do humano, podemos estimar o equivalente nos nossos testes de sobrevida, sendo que, nos animais submetidos ao Teste de Sobrevida e Regressão/Progressão Tumoral 1 mês após o término do tratamento (SV30), desde a o final da indução até o momento da eutanásia (semana 8 à semana 18), o procedimento experimental durou 10 semanas, ou seja 2,5 meses. Isso equivale à 6,25 anos do humano. Dessa forma, o teste de 3 meses após o término do tratamento (SV90) equivale à 11,25 anos e o de 6 meses (SV180) equivale à 20 anos do humano. Uma exceção são os grupos tratados apenas com Cisplatina, que por ter um tempo de tratamento mais curto, os testes de sobrevida de 1, 3 e 6 meses pós tratamento equivalem à 5, 10 e 18,75 anos do humano.

Nossos resultados demonstraram que as quatro estratégias terapêuticas obtiveram taxa de sobrevida de 100% nos testes de 1 e 3 meses pós tratamento, ou seja, não houve mortalidade nesses animais. Segundo a American Cancer Society (2018), a taxa de sobrevida relativa em 5 anos é de 77%, em 10 anos é de 70%, sendo assim, quando comparamos o tempo de vida de ratos e humanos, podemos dizer que os tratamentos realizados neste estudo mostraram taxas de sobrevida maiores do que as estimadas.

O Teste de sobrevida SV180 equivale de 18,75 - 20 anos do humano, neste teste esperava-se lidar com altas taxas de mortalidade, uma vez que a taxa de

sobrevida do CB em 15 anos cai para 65% (American Cancer Society, 2018). Nossos resultados mostraram que a taxa de sobrevida do tratamento com Cisplatina+OncoTherad foi de 25%, a menor de todas as estratégias terapêuticas testadas. Enquanto os tratamentos com os fármacos isolados apresentaram melhores resultados, o grupo tratado com OncoTherad IV mostrou uma taxa de sobrevida de 50%. E os melhores resultados, que ultrapassam as estimativas, foram vistos nos animais tratados apenas com Cisplatina, em que a taxa de sobrevida foi de 75%, e nos animais tratados com OncoTherad IP com taxa de sobrevida de 87,5%.

Entretanto é importante lembrar que os dados estatísticos baseados nos pacientes humanos considera, prioritariamente, pacientes em que quando diagnosticados realizaram ressecção transuretral (RTU) do tumor de bexiga e posteriormente tratamento com um fármaco específico, ou seja, nos tratamentos em que realizamos lidamos com o tumor primário intacto, e ainda assim conseguimos uma recuperação total (urotélcio normal, ausência de lesão) ou parcial (lesões não malignas) em diversos grupos tratados. Estes resultados podem significar uma alternativa para os pacientes não suscetíveis à RTU devido à outras comorbidades associadas. Além disso, os procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma doença altamente mórbida. O alto número de recorrências também é refletido nos altos custos que fazem do CBNMI uma das doenças mais caras para tratar, com um custo estimado de US\$ 96.000 a US\$ 187.000 por paciente desde o diagnóstico até a morte, nos Estados Unidos (Botteman, et al., 2003). Considerando o ponto de vista do paciente e o ponto de vista econômico, portanto, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que previnam a recorrência e a progressão da doença, permitam a preservação do órgão e a qualidade de vida dos pacientes e, finalmente, que forneçam uma opção para aqueles que são inelegíveis à cistectomia radical (Van der Heidjen & Witjes, 2009).

Ainda, cabe ressaltar novamente que 11% dos tumores não-músculo invasivos evoluem para o fenótipo invasivo em 4 anos (Shimada et al., 2011; Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Neste estudo, nenhum dos animais tratados apresentou evolução tumoral resultando no fenótipo músculo-invasivo,

evidenciando a inibição da progressão tumoral promovida pelos tratamentos com OncoTherad e Cisplatina.

Outro ponto relevante é o estudo da interação das diferentes modalidades terapêuticas com os mecanismos de proliferação celular, resistência à ação de fármacos e progressão tumoral, envolvendo as vias de sinalização de proteínas específicas, como p53, p21, HRAS-KRAS, PTEN, PI3K, AKT e mTOR, as quais são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial.

O estudo das proteínas supressoras de tumor consiste em uma ferramenta útil no momento de decidir sobre o melhor tratamento de pacientes afetados por alguma neoplasia. Muitos destes marcadores podem nos fornecer valiosas informações a respeito da agressividade de um tumor, determinando a terapia mais vantajosa. A proteína p53 é uma das mais estudadas, sendo um dos marcadores dos diferentes estágios de diversos tipos de câncer. Mutações no gene que codifica a proteína p53 ocorrem em 50 - 70% das neoplasias humanas, associam-se à pior sobrevida global livre de doença e têm sido implicadas na resistência às terapias anticâncer. Ainda, a expressão da p53 mutante indica um prognóstico preditivo (Zornig et al., 2001; Miller et al., 2005). Os tumores de bexiga não são exceção, tendo sido já descritas centenas de mutações diferentes associadas aos carcinomas do urotélio (Olivier et al., 2002).

A proteína p53 faz parte do processo de bloqueio do ciclo celular em casos em que ocorrem danos no DNA da célula, sinalizando o bloqueio no ponto de checagem na fase G1/S do ciclo. Nas células que apresentam o gene que codifica a p53 mutado e/ou inativação da proteína p53, não ocorre a parada do ciclo celular, necessária para o reparo do DNA (Cavalcanti Júnior et al., 2002). Essas células geneticamente instáveis tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de células com DNA mutado e consequente transformação neoplásica (Arruda, 2008).

Em células normais a concentração de p53 está abaixo dos valores detectáveis pela imunohistoquímica, já a p53 mutante se acumula nas células, sendo eliminada lentamente e expressa na imunohistoquímica. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo na imunorreatividade do antígeno p53 no

grupo MNU (Câncer), confirmando estudos anteriores que descrevem a uma correlação entre a expressão do p53 e a progressão dos tumores de bexiga.

Em pacientes com CB, em diversos estágios, Dias Neto et al. (2002) descreveram a boa correlação entre a positividade do p53 com a progressão da doença caracterizada pela maior incidência de metástases e pela menor sobrevida. Isto ocorreu inclusive para os tumores não-músculo invasivos pTa e pT1 no momento do diagnóstico. Estes dados permitem questionar o tratamento conservador (ressecção transuretral) de tumores superficiais em que o p53 é positivo (Dias Neto et al., 2002). Demonstrando também a importância deste marcador para o CB, auxiliando na identificação de pacientes que podem se beneficiar de tratamentos adicionais e uma vigilância mais próxima após a cistectomia.

Neste trabalho observamos que a imunoterapia com OncoTherad promoveu uma redução significativa na imunorreatividade de p53, independente da via de administração do fármaco (IP ou IV). Entretanto, nos animais tratados com Cisplatina a imunorreatividade para p53 ainda esteve aumentada, demonstrando que a imunoterapia, analisada por este marcador, é mais efetiva que a quimioterapia.

É importante ressaltar que neste estudo observamos a presença de imunomarcagem citoplasmática para o antígeno p53, no entanto sabe-se que a presença da p53 no núcleo da célula é essencial a sua função, sendo influenciada por diferentes mecanismos de controle da translocação núcleo-citoplasma que incluem fatores relacionados à importação e exportação nuclear da p53, sua localização subnuclear, fixação e sequestro citoplasmático (Kuroiwa-Trzmielina et al. 2009; Stommel et al. 1999). A maioria dos estudos, que utiliza a imunoistoquímica, não considera a localização citoplasmática como marcação, sendo que ela é frequente e tem ligação com o mecanismo de exportação nuclear de p53 para o citoplasma, promovido pela ação inibidora de Mdm2. O oncogene MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) leva à repressão da expressão de p53 por três mecanismos. No primeiro, Mdm2 se liga a p53 no seu domínio de transativação e bloqueia sua capacidade de ativar a transcrição. No segundo, promove a exportação nuclear de p53 para o citoplasma. E no terceiro, Mdm2 serve como uma ligase de ubiquitina que promove a degradação de p53 (Michael & Oren, 2003). Dos três mecanismos, destaca-se a ubiquitinação na

extremidade carboxi-terminal da cadeia polipeptídica, exportando a p53 do núcleo para o citoplasma, onde a p53 será degradada pelo proteossoma, justificando a esporádica expressão citoplasmática de p53 pela imunistoquímica e caracterizando uma forma mais agressiva de tumor (Zhang & Xiong, 2001;Teixeira et al., 2011).

O dano ao DNA desencadeia rotas celulares sinalizadoras que garantem que a p53 se acumule no núcleo através da fosforilação da proteína. Esse processo está associado à ativação da p53, que inibe sua exportação para o citoplasma. Assim, o reparo ocorre com a superexpressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo, que atua em alvos específicos e por mecanismos de transativação gênica, ativando outros genes e determinando a parada do ciclo celular no início da fase G1 e o reparo do DNA. No início do ciclo mitótico, o gene p53 ativa transcricionalmente o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que a célula pare na fase G1, até que complete o reparo do DNA. Quando p21 está conjugada à PCN (*proliferating cell nuclear antigen*), a proteína p53 irá promover o reparo no DNA. Pode ocorrer também a mutação do gene Tp53, que codifica a proteína p53, e nesses casos ocorre a formação de proteínas não funcionais, que podem conferir às células tumorais condições para sobreviverem e se replicarem (Huang et al., 2018).

A proteína p21 é uma das principais proteínas inibidoras do ponto de verificação G1/S, e sua regulação negativa pode levar ao desenvolvimento de vários tipos de tumores, pois é uma reguladora chave do ciclo celular (Tak et al., 2019). Desta forma, a relação da proteína p21 com os tratamentos antineoplásica tem sido recentemente mais explorada. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com OncoTherad promoveu um aumento significativo na imunorreatividade de p21, quando comparado aos grupos MNU (CB sem tratamento) e ao grupo tratado com Cisplatina.

Em um estudo realizado com biópsias de tumores vesicais de 73 pacientes, após a cistoscopia, Al Chalabi et al. (2019) demonstraram que a expressão do antígeno p21 fornece informações prognósticas importantes em pacientes com CB, uma vez que pacientes com tumores que mantiveram a expressão de p21 apresentaram uma taxa estatisticamente diminuída de recorrência do tumor e

sobrevida global aumentada, comparado àqueles cujos tumores perderam a expressão de p21 (Al Chalabi et al., 2019).

Ainda, analisando a imunorreatividade dos antígenos p53 e p21 na sobrevida dos animais tratados com cada estratégia terapêutica testada neste estudo, observamos a diminuição da imunorreatividade citoplasmática do antígeno p53 no tratamento com OncoTherad IP em todos os grupos experimentais, inclusive naqueles submetidos à períodos mais longos. Enquanto no tratamento com o mesmo fármaco na via intravesical (OncoTherad IV) houve aumento na imunorreatividade de p21 em todos os grupos experimentais com concomitante diminuição na imunorreatividade de p53 até SV90. Esses resultados demonstram que a imunoterapia com OncoTherad atua no controle do ciclo celular, modulando-o de forma positiva, contribuindo para que não ocorra a proliferação das células tumorais.

A via PI3K/AKT/mTOR é uma importante via de sinalização envolvida no crescimento celular, tumorigênese, invasão celular e resposta à droga. Esta via integra sinais de diferentes origens, como fatores de crescimento, hormonais, nutrientes, níveis de oxigênio e está associada a outras vias (Gust e So, 2009). No CB, foi relatado que esta via pode regular a invasão do tumor, portanto há hipótese de que variações genéticas nesta via podem afetar a sobrevivência dos pacientes (Chen et al., 2010).

Neste estudo analisamos a imunorreatividade para os antígenos da via Pi3K/AKT/mTOR na bexiga urinária dos animais sadios, induzidos ao CB e sem tratamento (Grupo MNU Câncer) e também naqueles tratados com OncoTherad, Cisplatina e com as duas estratégias terapêuticas associadas, em diferentes períodos de sobrevida. Nos animais do grupo MNU observamos um aumento na imunorreatividade dos antígenos envolvidos nesta via, no entanto somente o antígeno mTOR se mostrou estatisticamente maior, comparado ao grupo sadio (Controle). A superativação da via mediada por mTOR promove o comportamento mais agressivo da doença em vários tipos de câncer e a atividade do mTOR foi associada com a redução da sobrevida dos pacientes com CB e aumento do estágio de progressão tumoral (Ching e Hansel, 2010).

Entretanto, nossos resultados demonstraram que os tratamentos com OncoTherad e/ou Cisplatina não promovem grandes alterações nesta via, comparado ao grupo MNU (CB sem tratamento), e embora alguns grupos experimentais apresentassem aumento na imunorreatividade em algum destes antígenos, esse comportamento não persistia nos diferentes períodos de sobrevida. Contudo há uma relação entre o aumento da imunorreatividade dos antígenos da via PI3K/AKT/mTOR com os menores índices de Inibição da progressão tumoral (IPT), uma vez que, comparando as mesmas estratégias terapêuticas nos diferentes tempos de sobrevida, observamos que o aumento na imunorreatividade do antígeno AKT nos grupos Pós-Tratamento e SV30 tratados com OncoTherad IP acompanhou os menores índices de IPT. Já nos grupos tratados com o OncoTherad IV observamos o aumento na imunorreatividade do mTOR concordando com o menor índice de IPT no grupo SV180, enquanto o aumento na imunorreatividade do antígeno Pi3K nos grupos tratados com Cisplatina ou Cisplatina+OncoTherad também acompanhou os menores índices IPT destas estratégias terapêuticas.

A desregulação da via PI3K/AKT/mTOR tem sido implicada no desenvolvimento de carcinoma urotelial (Sun et al., 2011). Em condições normais, essa via é regulada negativamente pela fosfatase homóloga a tensina deletada no cromossomo 10 (PTEN), um gene supressor de tumor (Dahia, 2000; Angadi & Krishnapillai, 2012). PTEN codifica proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular. Mutações nesse gene levam ao favorecimento de surgimento de células neoplásicas, pois a proteína PTEN está envolvida no processo de apoptose, e com a perda de função da PTEN, as células escapam da apoptose (Costa, 2012).

Neste estudo, a análise da imunorreatividade para o antígeno PTEN dos grupos Pós-Tratamento mostrou um aumento significativo no grupo tratado com OncoTherad IV, concordando também com o maior IPT comparado às demais estratégias terapêuticas no mesmo período experimental. Ainda, quando comparamos os animais tratados com OncoTherad IV nos diferentes tempos de sobrevida, observamos um aumento na imunorreatividade de PTEN nos grupos experimentais até SV90, comparado ao grupo MNU. No entanto, em SV180, quando a imunorreatividade para este antígeno foi menor, houve também redução no IPT deste grupo. Contrariamente, quando os animais foram tratados com Cisplatina não

houve correlação entre o aumento na imunorreatividade de PTEN com os maiores índices de IPT, no entanto o aumento concomitante do Pi3K pode ser uma razão para que a efetividade antitumoral desta estratégia terapêutica fosse reduzida.

Claderaro et al. (2014) relataram diversas alterações moleculares dos efetores da via PI3K/AKT/mTOR no CB, incluindo deleções da PTEN (24-58% de CBMI T2-T3-T4), mutações ativadoras de PI3KCA, o gene que codifica a subunidade catalítica de PI3K (20% tumores baixo grau) e AKT (4,8% de CB). Ainda, estudos imunohistoquímicos relataram uma diminuição na expressão de PTEN em cerca de 50% do CB, e um aumento na expressão da pAKT em cerca de 88% dos casos (Claderaro et al., 2014). No entanto nossos resultados diferem da literatura se considerarmos que apenas o antígeno mTOR se mostrou alterado no grupo MNU (CB sem tratamento).

Entretanto, a literatura sugere que as maiores alterações nesta via se relacionem com estágios mais avançados do CB. Em 2011, Sun e colaboradores verificaram que no conjunto de pacientes com mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência, a longo prazo, um pequeno subconjunto com uma taxa de sobrevivência ainda pior, mostrou uma expressão elevada de p-mTOR e pAKT, indicando que o mTOR ativo e a AKT promovem a doença mais agressiva (Sun et al., 2011). Esta conclusão é corroborada pelo estudo de Hansel e colaboradores que demonstraram, que o p-mTOR ativo reduz a sobrevivência em pacientes com CBMI (Hansel et al., 2010). Sendo assim, com base nestes marcadores, podemos concluir que as diferentes estratégias terapêuticas testadas neste estudo não promovem a evolução para um pior estado patológico do CB, confirmando que o tratamento com OncoTherad e/ou Cisplatina são efetivos na inibição da progressão tumoral do CBNMI.

O presente trabalho analisou também a imunorreatividade das proteínas HRAS-KRAS, importantes marcadores prognósticos em vários tipos de câncer, uma vez que participam de diversos processos regulatórios nas células, tais como proliferação, diferenciação, migração, crescimento e sobrevivência. Em 1982, Der et al. descobriram que o gene HRAS, um dos primeiros oncogenes humanos descritos, também estava associado ao CB sendo identificado na linhagem celular T24. A importância das proteína RAS na sinalização intracelular foi elucidada por meio de

experimentos com microinjeção de RAS ativa e anticorpos anti-RAS, mostrando que RAS não é somente capaz de induzir o crescimento anormal característico de células de câncer, mas é necessária para a resposta de células normais à estimulação por fatores de crescimento (Lunke et al., 2017, Varga et al., 2017). Przybojewska et al. (2000) mostraram que H-RAS encontra-se ativo em 84% dos espécimes de CBMI, porém a relação entre as alterações em KRAS com o câncer urotelial ainda é pouco explorada. A proteína KRAS apresenta importante papel na regulação celular, participando de vários eventos, entre eles a proliferação celular. Esta proteína pode sofrer uma mutação oncogênica e devido a isso, estimular a célula a realizar proliferações sem controle. No CB há hipóteses de que esta proteína possa agir através da ativação da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) ou das vias AKT/STAT (Jebar et al., 2005).

Mo et al. (2007) estudaram H-RAS e o comportamento dos tumores vesicais não invasivos e demonstraram uma relação entre o oncogene e o grau e a agressividade tumoral. Os autores concluíram que a superativação de H-RAS por mutação puntiforme e superexpressão, é necessária e suficiente para induzir tumores vesicais não invasivos e que a inibição dessa atividade poderia ser uma alternativa terapêutica. Nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo na imunorreatividade do antígeno HRAS-KRAS nos grupos experimentais induzidos ao CBNMI com o carcinógeno MNU, confirmando estudos anteriores que relacionam a superexpressão destas proteínas com a indução do CB. No entanto, comparando as estratégias terapêuticas, baseadas no uso do OncoTherad e Cisplatina, com o grupo não tratado (MNU-Câncer) observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade das proteínas RAS após o tratamento. Ainda, quando analisamos a mesma estratégia terapêutica nos diferentes períodos de sobrevida e comparamos com o grupo não tratado, concluímos que as estratégias terapêuticas baseadas no tratamento com OncoTherad IP ou Cisplatina que não apresentaram aumento significativo na imunorreatividade de HRAS-KRAS são também aquelas que apresentam menor taxa de mortalidade, associada aos melhores índices de IPT, nos períodos mais longos de sobrevida (SV90 e SV180).

Contudo, para traçar a resposta molecular dos tumores vesicais mediante à cada estratégia terapêutica é importante que se analise não apenas a expressão de um marcador, mais sim as vias (incluindo as alternativas) em que estes marcadores podem atuar. O presente estudo confirma diversos ensaios realizados com pacientes humanos que foram acompanhados por um longo período, mostrando que o para se propor uma estratégia terapêutica ao CB, a partir de procedimentos experimentais em animais, é necessário que se analise a sobrevida pós tratamento, uma vez que estes tumores acompanham o doente recidivando e/ou evoluindo para fenótipos mais agressivos. Outro ponto relevante é que os tumores primários (primeiro diagnóstico) diferem daqueles mais avançados, em pacientes com mais tempo de doença e/ou recidivados, em relação às alterações genéticas e moleculares que estão presentes no CB. Sendo assim, cabe ressaltar a relevância do estudo da sobrevida pós-tratamento realizado neste trabalho, pois através de marcadores que se relacionam com a evolução e a agressividade do CBNMI, observamos que as diferentes estratégias terapêuticas testadas são capazes de inibir a progressão tumoral até nos períodos experimentais mais longos.

Ainda, a constatação feita neste trabalho de que a imunomarcacão nos diferentes grupos experimentais foi heterogênea para o mesmo antígeno, apresentando diferentes intensidades de imunorreatividade, viabiliza e sugere um estudo mais detalhado analisando e comparando o padrão da expressão destes marcadores nos diferentes tipos de carcinomas uroteliais não-músculo invasivos, no que se refere ao estadiamento do tumor vesical. Conhecer esses padrões pode ser muito relevante e vantajoso no momento de decidir qual é a melhor abordagem terapêutica para cada tipo de CBNMI, inclusive considerando a sobrevida pós-tratamento que nos permite inferir em que (ou até qual) momento determinada terapia representa maior efetividade antitumoral.

Contudo, os resultados em conjunto mostraram que as diferentes estratégias terapêuticas testadas neste estudo foram eficazes no tratamento do CB, não promoveram perda de peso corporal, promoveram inibição da progressão tumoral, e apresentaram taxas de sobrevida maiores do que as estimadas para os doentes que sofrem dessa neoplasia. Ainda, podemos inferir o papel exercido pelo OncoTherad no controle do ciclo celular, modulando expressão de oncogenes importantes na

carcinogênese urotelial. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que as estratégias terapêuticas baseadas na imunoterapia com OncoTherad e na quimioterapia com Cisplatina, podem constituir uma promissora alternativa para o tratamento do CBNMI.

6- CONCLUSÃO

Considerando os dados em conjunto, é possível concluir que:

- A análise da sobrevida pós-tratamento nos estudos experimentais do CBNMI é extremamente importante, uma vez que o IPT e a imunorreatividade dos marcadores analisados diferem com o aumento do período experimental.
- O tratamento com OncoTherad e/ou Cisplatina foi capaz de inibir a progressão tumoral, impedindo que as lesões uroteliais progredissem para o fenótipo músculo invasivo, inclusive nos grupos submetidos aos períodos experimentais mais longos.
- O tratamento com OncoTherad e/ou Cisplatina não promovem perda de peso corporal nos animais experimentais.
- A imunoterapia com OncoTherad se mostrou efetiva nas duas vias de administração, intraperitoneal e intravesical, promovendo IPT superior ao tratamento com Cisplatina no período Pós-Tratamento.
- O OncoTherad se mostrou mais efetivo do que a Cisplatina na sobrevida pós-tratamento de ratos com CBNMI quimicamente induzido.
- A estratégia terapêutica baseada na associação dos fármacos (Cisplatina+OncoTherad) não se mostrou mais efetiva em relação ao uso isolado dos fármacos.
- A imunoterapia com OncoTherad (IP ou IV) promoveu redução significativa na imunorreatividade citoplasmática de p53 e um aumento significativo na imunorreatividade de p21, sugerindo que esse fármaco possa atuar no controle do ciclo celular, modulando-o de forma positiva e, contribuindo para que não ocorra a proliferação das células tumorais.

- O aumento da imunorreatividade dos antígenos da via Pi3K/AKT/mTOR relacionou-se com os menores índices de Inibição da progressão tumoral (IPT).
- O aumento da imunorreatividade do antígeno PTEN nos grupos tratados OncoTherad IV relacionou-se com os maiores IPT comparado às demais estratégias terapêuticas no mesmo período experimental. Sendo que, quando a imunorreatividade para este antígeno foi menor, houve também redução no IPT promovido por este tratamento.
- O aumento na imunorreatividade de HRAS-KRAS relacionou-se com a taxa de mortalidade dos animais, uma vez que as estratégias terapêuticas baseadas no tratamento com OncoTherad IP e Cisplatina que não apresentaram aumento significativo na imunorreatividade de HRAS-KRAS são também aquelas que apresentam menor taxa de mortalidade associada aos melhores índices de IPT nos períodos experimentais mais longos (SV90 e SV180).
- As diferentes estratégias terapêuticas testadas neste estudo promoveram uma taxa de mortalidade inferior às descritas na literatura para pacientes com CBNMI.
- O OncoTherad e a Cisplatina se mostraram efetivos no tratamento do CBNMI e representam uma promissora estratégia terapêutica nos pacientes com falha ou recidiva após o tratamento com BCG ou àqueles ilegíveis à RTU.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJEI, A. A. Blocking oncogenic ras signaling for Câncer therapy. *Journal of the National Câncer Institute, Bethesda*, v. 93, n. 14, p. 1062-1074, 2001.

AHLQUIST, T.; BOTILLO, I.; DANIELSEN, S. A.; MELING, G. I.; ROGNUM, T. O.; LIND, G. E.; DALLAPICCOLA, B.; LOTHE, R. A. RAS signaling in colorectal carcinomas through alterations of RAS, RAF, NF1, and/or RASSF1A1. *Neoplasia, Houston*, v. 10, n. 7, p. 680-686, 2008.

AL CHALABI, R.; SALIH, S.; SAAD, S.; JAWAD, H. Expression of p53 and p21 in bladder carcinoma of Iraqi patients. *Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, v. 92, n. 1, 24 jun. 2019.

ALBERTS B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waltson JD. *Biologia Molecular Da Célula*. 4ª Ed. Brasil: Artes Médicas, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALTEKRUSE, S.F.; KOSARY, C.L.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; RUHL, J.; HOWLADER, N.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M.P.; LEWIS, D.R.; CRONIN, K.; CHEN, H.S.; FEUER, E.J.; STINCHCOMB, D.G.; EDWARDS B.K.:(eds) *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.

ALYASIRI, N. S. et al. PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 138, n. 1, p. 103-9, 2012.

American Cancer Society. Overview: bladder cancer. In: What are the key statistics about bladder cancer? [Internet. cited 12/-6/2018]. Available from: <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics/>. 2018.

ANDREAS, B.O.; BRANDAU, S.: Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.*; v.170, pp.964–969, 2003.

ANDREOLLO, N.A. et al . Rat's age versus human's age: what is the relationship?. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, São Paulo , v. 25, n. 1, p. 49-51, Mar. 2012.

ANGADI, P. V.; KRISHNAPILLAI, R. Evaluation of PTEN Immunoexpression in Oral Submucous Fibrosis: Role in Pathogenesis and Malignant Transformation. *Head and Neck Pathology*, v. 6, n. 3, p.314-21, 2012.

ARRUDA, Jalsi Tacon et al. Proteína P53 e o Câncer: controvérsias e esperanças. *Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia*, v. 35, n. 1, p. 123-141, dez. 2008.

ASKELAND, E.J.; NEWTON, M.R.; O'DONNELL, M.A.; LUO, Y.: Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv. Urol.*; v.2012, pp.181987, 2012.

BABJUK, M. ; Boehle, A.; Burger, M.; et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder; *Eur Assoc Urol*, v71 pp 447-461, 2016.

BADARI-OSAMA, A.; ABDEL, N.A.B.; KHALIFA, A.E. et al.: Differential alteration of cisplatin cytotoxicity and myelotoxicity by paclitaxel vehicle cremophor EL. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*; 361:339-44, 2000.

BAFFA, R., Letko, J., McClung, C., LeNoir, J., Vecchione, A., and Gomella, L. G. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res*, 25, 145-160, 2006.

BETTENDORF, O.; PIFFKO, J.; BÄNKFALVI, A.: Prognostic and predictive factors in oralsquamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.*; v.40, pp.110-119, 2004.

BHOLE, A.; BRANDAU, S.: Imune mechanisms in bacillus Calmette Guerin Immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.*; v.170, pp.964–969, 2003.

BLASIAK, J.; KOWALIC, J., TRZECIAK, A.; et al.: Cytotoxicity and DNA damage and repair in human lymphocytes exposed to three anticancer platinum drugs. *Neoplasma*; 46:61-3, 1999.

BOTTEMAN, M. F., Pashos C.L., Redaelli A., Laskin B., Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003; 21:1315–30.

BRASIL. Diretoria de Controle e Monitoramento Sanitários- Gerência Geral de Inspeção e Fiscalização Sanitária (ANVISA). Resolução - RE nº 3403/2016. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 2016 n. 244, p. 93, 21 dez. 2016.

CANAPARO, R.; CASALE, F.; MUNTONI, E. et al.: Plasma erythropoietin concentrations in patients receiving intensive platinum or nonplatinum chemotherapy. *Br J Clin Pharmacol*; 50:146-53, 2000.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. P53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CHATTERJEE, S. J., Datar, R., Youssefzadeh, D., George, B., Goebell, P. J., Stein, J. P., Young, L., Shi, S. R., Gee, C., Groshen, S., Skinner, D. G., Cote, R. J.; Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 22, 1007-1013, 2004.

CHEN, M., et alii. (2010). Genetic variations of the PI3K–AKT–mTOR pathway and clinical outcome in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Oxford Journals*, 31(8), pp. 1387-1391.

CHING, C., Hansel, D. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation*, volume 90, pp. 1406-1414, 2010.

CLADERARO, J. et alii.. PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 134, pp. 1776-1784, 2014.

COHEN, S.M.: Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. *Toxicol Pathol.*: v. 30, pp.663-71, 2002.

COQUERET O. New roles for p21and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends In Cell Biology*;13(2):65-70, 2003.

CORRALES, L.; GLICKMAN, L.H.; MCWHIRTER, S.M.; KANNE, D.B.; SIVICK, K.E.; KATIBAH, G.E.; WOO, S.R.; LEMMENS, E.; BANDA, T.; LEONG, J.J.; METCHETTE, K.; DUBENSKY, T.W. JR.; GAJEWSKI, T.F. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.*; v.11, p.1018-1030, 2015.

CRALLAN, R.A.; GEORGOPOULOS, N.T.; SOTHGATE, J.: Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*; v.27, pp.374–381, 2006.

DAHIA, P. L. M. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocrine-Related Cancer*, v. 7, n. 2, p.115-29, 2000.

DAMERON, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., Bouck, N. (1994). The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59, 483-489.

DE ALMEIDA CHUFFA, L G et al. P-MAPA immunotherapy potentiates the effect of cisplatin on serous ovarian carcinoma through targeting TLR4 signaling. *Journal of Ovarian Research*, v. 11, n. 1, 2018.

DIAS NETO, J. A.; Martins, A. C. P.; Pastorello, M. T.; Suaid, H. J.; Tucci Jr, S.; Cologna, A. J.: "P53 nuclear expression in bladder transitional cell carcinoma". *Acta Cir. Bras.*, São Paulo , v. 17, supl. 3, p. 29-33; 2002.

DIAS, Q.C.; NUNES, I.D.; GARCIA, P.V.; FAVARO, W.J. Potential therapeutic strategies for non - muscle invasive bladder cancer based on association of intravesical immunotherapy with p-mapa and systemic administration of cisplatin and doxorubicin. *Int Braz J Urol.*; v.42, p.942-954, 2016.

DURÁN, N., DIAS, Q.C., FÁVARO, W.J.; OncoTherad: A New Nanobiological Response Modifier, its Toxicological and Anticancer Activities. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1323 012018, 2019.

DUURSMA, A. M.; AGAMI, R. Ras interference as cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 267-273, 2003.

EFEYAN, A. e Sabatini, D. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 22, pp. 169-176, 2010.

EPSTEIN, J.L.; AMIN, M.B.; REUTER, V.R.: The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol.*; v.22, pp.1435-1448, 1998.

ESRIG, D., Elmajian, D. Groshen, S., Freeman, J. A., Stein, J. P., Chen, S. C., Nichols, P. W., Skinner, D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*, 331, 1259-1264, 1994.

ESRIG, D., Spruck, C. H. 3rd, Nichols, P. W., Chaiwun, B., Steven, K., Groshen, S., Chen, S. C., Skinner, D. G., Jones, P. A., Cote, R. J. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*, 143, 1389-1397, 1993.

FÁVARO W.F., Durán N. Process of obtaining a nanostructured complex (CFI-1), associated to nanostructured CFI-1 with a protein (MRB-CFI-1) and its use. *Brazilian Patent PIBR 10.2017.012768.0*, 2017.

FÁVARO W.F., Iantas SR, Gonçalves JM, Dias QC, Reis IB, Billis A, Durán, N, Alonso, JCC. Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer. *J Clin Oncol.*; 37(15 suppl.): e16004, 2019.

FÁVARO W.F., Iantas SR, Gonçalves JM, Socca EAR, Durán, N, Billis A, Alonso, JCC. Single-arm phase I/II study of the safety and efficacy of OncoTherad immunomodulator in patients BCG-refractory or relapsed non-muscle invasive bladder cancer. *J Clin Oncol.*; 37(15 suppl.): e16000, 2019.

FERREIRA, Carmen V.; MILANI, Renato; ZAMBUZZI, Willian Fernando; CARVALHO, Hernandez F. A Célula: Transdução de Sinal. 3ª. ed. rev. São Paulo: Editora Manole Ltda., cap. 30, p. 489-500. ISBN 978-85-204-3454-3, 2013.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.; et, al.: *Oncologia Molecular*. pp98, 213-214. Editora Atheneu, 1ª ed; São Paulo, SP, 2004.

FREEMAN, D.J.; LI, A.G.; WEI, G.; LI, H.; KERTÉSZ, N.; LESCHE, R.: PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*; v.3; pp.117-130, 2003.

FUKUSHIMA, S.; COHEN, S.M.; ARAI, M.; JACOBS, J.B.; FRIEDEL, G.H.: Scanning electronmicroscopic examination of reversible hyperplasia of the rat urinary bladder. *Am J Pathol.*: v. 102, pp.373-80, 1981.

GARCIA, P.V.; APOLINÁRIO, L.M.; BÖCKELMANN, P.K.; NUNES, I.S.; DURÁN, N.; FÁVARO, W.J. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol.*; v.8, p.4427-4443, 2015.

GIACCONE, G.: Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59: 9-17, 2000.

GOEBELL, P. J., Groshen, S. G., Schmitz-Dräger, B. J. International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer-a new approach to an old question. *Urol Oncol*, 28, 377-388, 2010.

GOLDSTEIN, R.S.; MAYOR, G.H.: The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci*; 32:685-90, 1983.

GONZÁLEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J.M.: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* 59: 657-663, 2001.

GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; SEIDEL, A.; JACOB, J.: Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ.*: v. 247, pp.81-90, 2000.

GUST, K., So, A. The role of mTOR in bladder cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 8:24, pp. 2348-2350, , 2009.

HALL, M.C.; CHANG, S.S.; DALBAGNI, G.; PRUTHI, R.S.; SEIGNE, J.D.; SKINNER, E.C.; WOLF, J.S. JR.; SCHELLHAMMER, P.F.: Guideline for the management of non muscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol.*; v.178, pp.2314-2330, 2007.

HANSEL, D., et alii. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Cellular Proliferation and Tumor Growth in Urothelial Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, volume.176, n. 6, pp. 3062-3072, 2010.

HAO SY, Qing Y, Hui WL, Li G, Rong T, Kang Y, et al. Monitoring gene expression profile changes in bladder transitional cell carcinoma using cDNA microarray. *Urol Oncol*; 7:207-12, 2002.

HIDAKA, S.; FUNAKOSHI, T.; SHIMADA, H. et al.: Comparative effects of diethyldithiocarbamate and N-benzyl-D-glucaminedithiocarbamate on cisdiamminedichloroplatinum-induced toxicity in kidney and gastrointestinal tract in rats. *J Appl Toxicol*; 15:267-73, 1995.

HOLLSTEIN, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørli, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R., Harris, C. C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, 22, 3551-3555, 1994.

HUANG J., Deng G. , Liu T., Chen W., Zhou Y.; Long noncoding RNA PCAT-1 acts as an oncogene in osteosarcoma by reducing p21 levels. *Biochem. Biophys. Res. Comum.*, 495, pp. 2622 - 2629, 2018.

INCA - <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>. (INCA - Instituto Nacional do Cancer-Brasil-2018).

INCA. Consenso nacional de nutrição oncológica – Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 126 p; 2009.

INCA. Estimativa 2018. INCA - Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, 2019.

ISIDORO A, CASADO E et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*, 26(12), 2095-104, 2005.

ISIDORO A, MARTINEZ M et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem. J.*, 378, p.17-20, 2004.

JEBAR, A.H. , Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F., Knowles, M.A.; FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*. 24:5218-25, 2005.

JI-HYUN, C; CHARIS, E.: Nuclear-Cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.*;v.65, pp.8096-8100, 2005.

JUSTO GZ, DURÁN N, QUEIROZ MLS. Effects on splenic T lymphocytes in Ehrlich ascites tumor-bearing mice (EAT) induced by P-MAPA - Role of cytokines. *Int J Mol Med.*, v.4, p.49, 1999.

KAUSCH I, Bohle A. Molecular Aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol*. 2002; 41:15-29.

KEMP, T.J.; LUDWIG, A.T.; EAREL, J.K.; MOORE, J.M.; VANOOSTEN, R.L.; MOSES, B.;LEIDAL, K.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S.: Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L.Blood.; v.106, pp.3474-3482, 2005.

KIM IY, KIM SJ. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. *Cancer Lett*,241:118-123, 2006.

KNOWLES, M. et alii. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 28(3-4), pp. 305-316, 2009.

KOHN, K.W.; POMMIER, Y.: Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.*;v.331, pp.816-827, 2005.

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

LAMM, D.L.; STOGDILL, V.D.; STOGDILL, B.J.; CRISPEN, R.G.: Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J Urol.*; v.135, pp.272-274, 1986.

LANE, D. P. p53 and human cancers. *Br Med Bull*, 50, 582-99, 1994.

LAPLANTE, M. e Sabatini, D. mTOR Signaling. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1-3; 2012.

LAPLANTE, M., Sabatini, D.M.; mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*. 149:274-93, 2012.

LEOPOLD, W.R.; MILLER, E.C., MILLER, J.A.: Carcinogenicity of antitumor cis-platinum (II) coordination complexes in the mouse and rat. *Cancer Res.*, 39:913-918, 1979.

LEWIS, A.S.: Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 278:F867-74, 2000.

Li LJ, Tang JT, Jia LQ, Li PW. Mutations of gene exons 4-8 in human esophageal cancer. *World J Gastroenterol*; 11(19):2998-3001, 2005.

LUNKE, S. et al. Intratumorous heterogeneity for RAS mutations in a treatment-naïve colorectal tumour. *Journal of Clinical Pathology*, jclinpath-2017-204327. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204327>. 2017.

MALMSTROM, P. U.; Drugs and risk of cancer. *Scandinavian Journal of Urology*, 51: 3, 212-218, 2017.

MANSO, C. [Oncogenes]. *Acta medica portuguesa*, v. 7, n. 4, p. 171-176, 1985.

MAZUR, L.; CZYZEWSKA, A.; AUGUSTYNEK, A.: WR-2721: Inhibitor of cisplatin-induced micronuclei. *Teratog.Carcinog.Mutagen.*,20:349-356, 2000.

MELLO, J.A.; TRIMMER, E.E.; KARTALOU, M., ESSIGMANN, J.M.: Conflicting roles of mismatch repair and nucleotide excision repair in cellular susceptibility to anticancer drugs. *Nucleic Acids MolBiol*,pp12:249-74, 1998.

MICHAEL, D., Oren, M.; The p53 and MDM2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*; 12(1):53-9, 2002.

MILED G, Pontoglio M, Garbay S, Yaniv M, Weitzman JB. A genomic map of p53 binding sites identifies novel p53 targets involved in an apoptotic network. *Cancer Res* 2005;65(12):5096-104.

MILLER, L.D.; SMEDS, J.; GEORGE, J.; VEJA, V.B.; VERGARA, L.; PLONER, A.; PAWITAN, Y.; HALL, P.; KLAAR, S.; LIU, E.T.; BERGH, J. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.102, n.38, p.13550-13556, 2005.

MITRA, A. P. and Cote, R. J. (2009). Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 251-285.

MO, L.; Zheng, X.; Huang, H.Y.; Shapiro, E.; Lepor, H.; Cordon-Cardo, C.; Sun, T.T.; Wu, X.R.; Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest.* ;117(2):314-25, 2007.

MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A.: The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol.*; v.13, pp.143-153, 2005.

MORALES, A. EIDINGER, D.; BRUCE, A.W.: Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol.*; v.115, pp.377-380, 1976.

MOREIRA, J. C.; WAITZBERG, D. L. Consequências funcionais da Desnutrição. In: *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, p. 399-410, 2000.

NAKATANI F., Tanaka K, Matsumoto Y, Matsunobu T, Sakimura R, Iwamoto Y. Identification of p21 gene as a direct target of ew5-flii fusion protein in ewing's sarcoma cells. 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 25-28, San Fransisco, California. p.0305, 2001.

NETO J.A.D., Martins ACP, Pastorello MT, Suaid HJ, Tucci JrS, Cologna AJ. Expressão nuclear do p53 em carcinoma de células transicionais da bexiga. *Acta Cirurg Br*; 17(Supl 3):29-33, 2002.

NETTO JÚNIOR, N.R.; et al.: *Urologia prática*. pp223-224. Editora Atheneu, 4ª ed; São Paulo, SP, 1999.

NISHIZAKI, M., Fujiwara, T., Tanida, T., Hizuta, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., Bouvet, M., Roth, J. A., Tanaka, N. Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res*, 5, 1015-1023, 1999.

O'PREY J., Brown J., Fleming J., Harrison P.R. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*; 66:2075-2088, 2003.

OKI, E.; TOKUNAGA, E.; NAKAMURA, T.; UEDA, N.; FUTATSUGI, M.; MASHINO, K.: Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Letters*; v. 227, pp.33-38, 2005.

OLIVEIRA, P.A.; COLACO, A.; DE LA CRUZ, P. L.F.; LOPES, C.: Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *ExpOncol.*: v.28, pp.2-11, 2006.

OLIVIER, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19, 607-614.

OTTERY, F. D. Cancer cachexia: prevention, early diagnosis and management. *Cancer Practice*, v. 2,n. 2, p. 123-131, 1994.

OYASU, R.: Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem Toxicol.*: v. 33, pp.747-55, 1995.

PACKIAM, V.T.; Johnson, S.C.; Steinberg, G.D.; Non-muscle-invasive bladder cancer: Intravesical treatments beyond Bacille Calmette-Guérin. *Cancer* 1;123(3):390-400, 2017.

PERABO, F.G.; WILLERT, P.L.; WIRGER, A.: Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res.*; v.25, pp.3565-3573, 2005.

PRIOR, I. A.; HANCOCK, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of Cell Science*, London, v. 114, n. 9, p. 1603-1608, 2001.

PRZYBOJEWSKA, B., Jagiello, A., & Jalmuzna, P.; H-RAS, K-RAS, and N-RAS gene activation in human bladder cancers. *Cancer genetics and cytogenetics*, 121(1), 73-77, 2000.

PUZIO-KUTER, A.M.; CASTILLO-MARTIN, M.; KINKADE, C.W.; WANG, X.; SHEN,T.H.; MATOS T.; SHEN, M.M.; CORDON-CARDO, C.; ABATE-SHEN, C.: Inactivation of p53 and PTEN promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev.*; v.23, p.675-680, 2009.

RAFNAR, T. et al.: European genome-Wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene. *Human Molecular Genetics*, Vol. 20, No. 21, pp. 4268-4281, 2011.

REBOLLO, A.; MARTÍNEZ, C. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood*, New York, v. 94, n. 9, p. 2971-2980, 1999.

REIS LO, FERREIRA U, BILLIS A, CAGNON VH, FÁVARO WJ. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol.*, v.2, p.438-445, 2012.

REIS, L.O.; FÁVARO, W.J.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; FAZUOLI, M.G.; CAGNON, V.H.: Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol.*; v.28,pp.499-505, 2010.

REIS, L.O.; PEREIRA, T.C.; FAVARO, W.J.; CAGNON, V.H.; LOPES-CENDES, I.; FERREIRA, U.: Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. *World J Urol.*; v.27, pp.353-361, 2009.

RO, J. Y.; STAERKEL, G. A.; AYALA, A. G.: Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.*; v.19, pp. 435–453, 1992.

SAMANT, R.S., Shevde, L.A.; Recent Advances in Anti-Angiogenic Therapy of Cancer. *Oncotarget*; 2:122-34, 2011.

SAXTON, ROBERT A.; SABATINI, DAVID M.. MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, [s.l.], v. 168, n. 6, p.960-976, Elsevier BV. 2017.

SCHAMHART, D.H.; BOER, E.C.; REIJKE, T.M.: Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol.*; v.37, p.16, 2000.

SCHATTSCHEIDER, J.; WASNER, G.; BARON, R.: Chemotherapy induced neuropathy. *Aktuel. Neurol.*, 28:53-61, 2001.

SENESSE, P. et al. Nutritional support during oncologic treatment of patients with gastrointestinal cancer: who could benefit? *Cancer Treatment Reviews*, v. 34, n. 6, p. 568-575, 2008.

SERRANO, C., Morales, R., Suárez, C., Núñez, I., Valverde, C., Rodón, J., ... & Carles, J. Emerging therapies for urothelial cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(4), 311-317, 2012.

SHALITIN, C., Epelbaum R, Moskovitz B et al. Increased level of 21-kda protein in the circulation of tumor-bearing patients. *Cancer Detection And Prevention*; 15(5):357-365, 1994.

SHIMADA, K.; FUJII, T.; ANAI, S.; FUJIMOTO, K.; KONISHI, N.: ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BMC Urol.*; v.11, pp.22, 2011.

SHIROTA, Y.; SHIROTA, H.; KLINMAN, D.M. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.*; v.188, p.1592-1599, 2012.

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

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. HPV e câncer: o papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 29, p. 48-54, 2003.

SMITH, N. D., Rubenstein, J. N., Eggener, S. E., Kozlowski, J. M. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol*, 169, 1219-1228, 2003.

SNIETURA, M. et al. PTEN as a Prognostic and Predictive Marker in Postoperative Radiotherapy for Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. *Plos One*, v. 7, n. 3, p. e33396, 2012.

SOCIETY, A. C. Cancer Facts & Figures 2018-2019. American Cancer Society, 2019

SONPAVDE, G.; PETRYLAK, D.P.: Perioperative chemotherapy for bladder cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 27, Article in Press, 2005.

STECK, P.A.; PERSHOUSE, M.A.; JASSER, S.A.; YUNG, W.K.; LIN, H.; LIGON, A.H.; LANGFORD, L.A.; BAUMGARD M.L.; HATTIER T.; DAVIS T.; FRYE C.; HU R.; SWEDLUNDB.; TENG D.H.; TAVTIGIAN S.V.: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers". *Nat. Genet.*; v.15, p.356-362, 1997.

STEINBERG, G.D.; BRENDLER, C.B.; ICHIKAWA, T.: Characterization of an N-methyl-N-nitrosourea induced autochthonous rat bladder cancer model. *Cancer Res.*; v.50, pp.6668-6741, 1990.

SUN, C., Chang, Y., Pan, C.; Activation of the PI3K / Akt / mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology*, 58, pp. 1054-1063, 2011.

SYLVESTER, R.J.; van der MEIJDEN, A.P.; LAMM, D.L.: Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.*; v.168, pp.1964-1970, 2002.

TABASSUM, S.; AFZAL, M.; ARJMAND, F.: New heterobimetallic CuII—SnIV2 complex as potential topoisomerase I inhibitor: In vitro DNA binding, cleavage and cytotoxicity against human cancer cell lines *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; v.115, pp.63-72, 2012.

TEIXEIRA, M.; SOBRAL, A.; LIMA, M.; MAIA, F.; CHRISTILIS, M.; SOUZA, D.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Avaliação da superexpressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 31, n. p. 521-526, 2011.

TURNBULL, D.; POPESCU, N.C.; DiPAOLO, J.A. et al.: Cis-platinum (II) diammine dichloride causes mutation, transformation, and sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Mutat Res*; 66:267-75, 1979.

ULLMANNOVA, V.; Stockbauer, P.; Hradcová, M.; Soucek, J.; Haskovec, C. Relationship between cyclin d1 and p21waf1/cip1 during differentiation of human myeloid leukemia cell line. *Leukemia Res*; 27:1115-1123, 2003.

VALLEJO, C.G; CRUZ-BERMÚDEZ, A. et al. Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis. *Biochimie*, 95(6):1171-1176, 2013.

VAN DER HEIJDEN, A.G. e Witjes, J.A.; "Recurrence, Progression, and Follow-Up in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer ", *Eur. Urol Supl.* 8 (7), 556-562, 2009.

VAN DER WEYDEN, L., Adams, D.J.; The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta*.1776(1):58, 2007.

VARGA, A. et al. RAF1/BRAF dimerization integrates the signal from RAS to ERK and ROK α . *Sci. Signal.* 07 Mar 2017: Vol. 10, Issue 469, eai8482 DOI: 10.1126/scisignal.aai8482. 2017.

VARMUS H. The new era in cancer research. *Science*, 312: 1162-1165, 2006.

VERMONKEN, J.B.; KAPTEIJN, T.S.; HART, A.A.M. et al: Ototoxicity of cisdiamminedichloroplatinum (II): influence of dose, schedule and mode of administration. *Eur J Cancer ClinOncol*; 19:53-8, 1983.

WILLIAMS, P.D.; LEE, J.K.; THEODORESCU, D.: Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. *Neoplasia.*: v. 10, pp.838-46, 2008.

WON, H. S. et al. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, v. 48, n. 10, p. 985- 90, 2012.

YAMADA, K. M.; ARAKI, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science*, v. 114, n. 13, p 2375-82, 2001.

YANG, X.L.; WANG, A.H.: Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol. Ther.*, 83:181-215, 1999.

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

ZHANG, N.; FAN, Y.; ZHANG, Z.; ZUO, J.; ZHANG, P.; WANG, Q.; LIU, S.: Syntheses, crystal structures and anticancer activities of three novel transition metal complexes with Schiff base derived from 2-acetylpyridine and l-tryptophan. *Inorg.Chem. Commun.*; v.22; pp.68-72, 2012.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science, New York*, v. 292, n. 5523, p. 1910-1915, 2001.

ZHANG, Y.; ZHU, C.; CURADO, M.P.; ZHENG, T.; BOYLE, P.: Changing patterns of bladder cancer in the USA: evidence of heterogeneous disease. *BJU Int.*; v.109; pp.52-56, 2011.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A. O.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta, Frankfurt*, v.1551, p.1-37, 2001.

8- ANEXOS

ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **NOVAS PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: IMUNOMODULADOR P-MAPA e CISPLATINA**, registrada com o nº **4324-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Wagner José Fávoro e Quella Cristina Dias**, 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 **16 de agosto de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	31/08/2015-31/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	31/08/2015-31/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / Ficher 344/NTacUnib
No. de animais:	126
Peso / Idade:	07 semanas / 160g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 16 de agosto de 2016.

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.

ANEXO B



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Novas Perspectivas Terapêuticas para o Tratamento do Câncer de Bexiga Urinária Não-músculo Invasivo: Imunomodulador P-mapa e Cisplatina", (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4324-1), de responsabilidade do Prof. Dr. Wagner José Fávaro e da aluna Queila Cristina Dias, teve o título alterado para "Características dos Tratamentos e seus Efeitos na Sobrevida de Ratos Induzidos Quimicamente ao Câncer de Bexiga Urinária Não-músculo Invasivo: Novas Perspectivas Terapêuticas Baseadas no Uso do OncoTherad (MRB-CFI-1) e Cisplatina".

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 16/08/2016.

Campinas, 12 de dezembro de 2019.

Profª. Drª. Cinthia Baú Betim Cazarin
Vice-Presidente da CEUA/UNICAMP

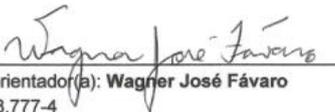
Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

ANEXO C**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Características dos Tratamentos e seus Efeitos na Sobrevida de ratos induzidos quimicamente ao Câncer de Bexiga Urinária não-músculo invasivo (CBNMI): Novas Perspectivas Terapêuticas baseadas no uso do OncoTherad (MRB-CFI-1) e Cisplatina**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Janeiro de 2020.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Queila Cristina Dias**
RG n.º 33.262.547-3

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Wagner José Fávaro**
RG n.º 33.478.777-4