

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

IANNY BRUM REIS

"NOVA PERSPECTIVA TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: O MODIFICADOR DE RESPOSTA BIOLÓGICA – COMPLEXO FOSFATO INORGÂNICO 1 (MRB-CFI-1)"

"NEW THERAPEUTIC PERSPECTIVES FOR NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER: THE BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIER – INORGANIC PHOSPHATE COMPOUND (MRB-CFI-1)"

CAMPINAS

## IANNY BRUM REIS

## "NOVA PERSPECTIVA TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: O MODIFICADOR DE RESPOSTA BIOLÓGICA – COMPLEXO FOSFATO INORGÂNICO 1 (MRB-CFI-1)"

## "NEW THERAPEUTIC PERSPECTIVES FOR NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER: THE BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIER – INORGANIC PHOSPHATE COMPOUND (MRB-CFI-1)"

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 concentração Anatomia.

Tesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Ph.D. in Cellular and Structural Biology in the concentration area Anatomy.

Orientador: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA IANNY BRUM REIS E ORIENTADA PELO PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO.

### CAMPINAS

2021

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

Reis, lanny Brum, 1992-R277n Nova perspectiva terapêutica para o câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo : o modificador de resposta biológica - complexo fosfato inorgânico 1 (MRB-CFI-1) / Janny Brum Reis. - Campinas, SP : [s.n.], 2021. Orientador: Wagner José Fávaro. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Câncer. 2. Bexiga. 3. Imunoterapia. 4. Sistema imunológico. 5. Receptores Toll-like. I. Fávaro, Wagner José, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer : the biological response modifier - inorganic phosphate compound (MRB-CFI-1) Palavras-chave em inglês: Cancer Bladder Immunotherapy Immune system Toll-like receptors Área de concentração: Anatomia Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Wagner José Fávaro [Orientador] Murilo Vieira Geraldo Ângela Cristina Malheiros Luzo Andrigo Barboza de Nardi Wellerson Rodrigo Scarano Data de defesa: 25-10-2021 Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

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

ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-2939-3501
Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/5836627398260742

Campinas, 25 de outubro de 2021.

# **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo Prof. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

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 do Instituto de Biologia.

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que sofrem com câncer, em especial aos que lutam contra o câncer de bexiga urinária.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida, por iluminar meus caminhos, e ser minha força nos momentos mais difíceis. E a Nossa Senhora, que sempre me cobre com seu manto protetor.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Wagner José Fávaro, pelos ensinamentos, pela paciência, e por me inspirar a ser uma pessoa melhor. Muito obrigada por acreditar e investir no meu potencial, pela confiança, por todo o suporte para conclusão desse trabalho. Obrigada, principalmente, por me mostrar a importância de sermos seres humanos mais humanos e trabalhar em prol de uma sociedade mais justa e igualitária.

Ao meu co-orientador, Dr. Nelson Durán, pelos conhecimentos compartilhados, e por estar sempre disponível para solucionar dúvidas, corrigir trabalhos e pelas conversas e "cafézinhos".

Às fundações de amparo a pesquisa pelo suporte financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha mãe, pelo amor incondicional, carinho, dedicação, apoio, preocupação, por ouvir meus desabafos, por entender as ausências, e por sempre ter um colo disponível. Eu te amo muito e nenhuma palavra expressa o quanto sou grata por ter você.

Ao Spike pelo amor incondicional. "Não existe dia ruim quando você chega em casa e recebe o amor de um cachorro"!

À minha vovó Graça (*in memoriam*), por ter sempre apoiado meus sonhos e me fazer acreditar que o céu é o limite. Meu exemplo de amor, força e sabedoria, que desde minha infância me incentivou a dar o melhor de mim.

Ao Luiz Tibo pela parceria durante os experimentos *in vivo* e por toda a ajuda com as análises e discussão dos resultados, troca de experiências e conhecimentos.

À Bianca Ribeiro, por todo conhecimento e ideias compartilhados. Pela ajuda com as

estatísticas e discussão dos resultados, pela paciência, apoio, parceria e amizade. Obrigada por estar sempre disponível e por poder contar com você! Você se tor uma grande amiga, que vou levar para a vida toda.

Ao Leandro, por todo apoio, incentivo, carinho e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia: Eduardo, Petra, Bianca, Melissa, Ariane, Gabi Oliveira, Gabi, Sabrina, Natália, Ju, Marcela, Lu Orsi, Alexandra e Queila por todo conhecimento compartilhado e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos amigos do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, e companheiros de PED: Catharina e Júnior, por todo o conhecimento compartilhado, troca de protocolos e reagentes, por tornarem os dias mais leves, e pela amizade fora do laboratório.

Ao meu amigo Jhonne Torres, que apesar do "divórcio acadêmico" sempre me apoiou, e compartilhou os sofrimentos e alegrias durante todo esse processo.

À minha irmã Lu Altoé, obrigada por todo apoio, mesmo estando distante fisicamente. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, trocas de protocolos, e pelo ombro (e ouvidos) sempre disponíveis.

Às minhas Lulus lindas, Kariny, Ully, Bruninha, Lourdes e Lorena, por mesmo longe se fazerem tão presentes, obrigada pelas palavras de estímulo, por estarem sempre disponíveis. Obrigada pela amizade, companheirismo, confiança e conselhos.

A todos os professores do Departamento de Anatomia e Departamento de Biologia Celular, muito obrigada pelo conhecimento e vivência compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, em especial ao técnico Roberto, pela atenção e prestatividade, por todas as explicações em relação a boas práticas de laboratório e descartes de reagentes.

Aos membros da banca pela atenção, disponibilidade, por aceitarem o convite e por todas as contribuições.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho!

### RESUMO

O câncer de bexiga urinária (CB) é a segunda neoplasia mais comum do trato urinário, e o nono tipo mais incidente em nível mundial. O estadiamento histológico do CB é determinado pela profundidade de invasão tumoral da parede vesical e pode ser classificado em nãomúsculo invasivos (pTis, pTa e pT1) e músculo invasivos (pT2a, pT2b, pT3a, pT3b e pT4). Cerca de 75% dos cânceres de bexiga são não-musculo invasivos (CBNMI). Atualmente, a forma mais eficaz para o tratamento do CBNMI é a imunoterapia com BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Contudo, o uso do BCG está frequentemente associado a efeitos adversos locais e/ ou sistêmicos, além de recorrência tumoral em até 30% dos casos. Há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do câncer, incluindo o CBNMI. Compostos que atuam como agonistas dos receptores Toll like (TLRs) são candidatos promissores. Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa desenvolveu o OncoTherad®, um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos (CFI-1) associado a uma proteína glicosídica (P14-16), que possui patente depositada na fase inicial nacional do PCT (Número: BR 1020170127680) pela agência de inovação INOVA-UNICAMP. Ele atua como um modificador de resposta biológica, desencadeando a estimulação do sistema imunológico. No presente estudo objetivou-se caracterizar os mecanismos de ação desse composto. Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados sessenta camundongos C57BL/6J provenientes do CEMIB da UNICAMP. Dez animais foram destinados ao grupo controle e. em cinquenta animais, o CBNMI foi induzido quimicamente. Após a indução do CBNMI, os animais foram divididos em 5 grupos (n=10): Câncer, Câncer+MRB-CFI-1 (OncoTherad®), Câncer+P14-16, Câncer+CFI-1 e Câncer+BCG. Após 6 semanas de tratamento, os animais foram eutanaziados, a bexiga foi coletada e processada de acordo com protocolos convencionais para histopatologia, imuno-histoquímica e western blotting. Os resultados obtidos através das análises histopatológicas demonstraram que após o tratamento com OncoTherad® houve redução da progressão tumoral em 100% dos animais. A análise imunohistoquímica dos componentes das vias TLR2 e TLR4 demonstraram que, ao contrário do tratamento convencional com BCG, o OncoTherad® estimulou a via não-canônica, aumentando a expressão de TLR4, TRIF, IRF3 e induzindo a ativação de IFN. Animais tratados com OncoTherad® apresentaram redução da imunorreatividade de RANK e RANKL, o que é indicativo de bom prognóstico no que diz respeito ao aparecimento de metástases. O checkpoint PD1/PD-L1 apresentou expressão reduzida após o tratamento com OncoTherad®. levando-nos a inferir que a imunomodulação ocorre devido a redução de linfócitos T regulatórios e, consequentemente, aumento de linfócitos T citotóxicos, que poderão reconhecer as células tumorais e eliminá-las, o que foi confirmado pela diminuição da expressão de FOXP3 nesse grupo de tratamento em relação ao grupo Câncer. O OncoTherad® mostrou também desempenhar papel importante no aumento da expressão de P53 em relação ao tratamento convencional com BCG, podendo ser um dos mecaniamos desse imunoterápico para evitar que linhagens de células cancerígenas se multipliquem. Os compostos orgânico (P14-16) e inorgânico (CFI-1) que compõe o OncoTherad® (MRB-CFI-1) não apresentaram redução satisfatória da progressão tumoral quando avaliados separadamente, e mostraram padrões distintos de imunorreatividade para as vias analisadas quando comparados aos grupos Controle e Câncer porém, quando associados (MRB-CFI-1), apresentam resultados promissores na imunomodulação e diminuição da progressão do CBNMI.

**Palavras-chave:** câncer de bexiga; imunoterapia; OncoTherad; nanofármaco; receptores *Toll-Like*; imunomodulador; linfócitos Treg.

## ABSTRACT

Urinary bladder cancer (BC) is the second most common neoplasm of the urinary tract, and the ninth most incident type worldwide. The histological staging of BC is determined by the depth of tumor invasion of the bladder wall and can be classified into non-muscle invasive (pTis, pTa and pT1) and muscle invasive (pT2a, pT2b, pT3a, pT3b and pT4). About 75% of bladder cancers are non-muscle invasive (NMIBC). Currently, the most effective treatment for NMIBC is immunotherapy with BCG (Bacillus Calmette-Guérin). However, it is often associated with local and/or systemic adverse effects, in addition to tumor recurrence in 30% of cases. There is an intense search for the development of new molecules for the treatment of cancer, including NMIBC. Compounds that act as Toll like receptors (TLR) agonists are promising candidates. Our research group developed OncoTherad®, a nanometric compound of phosphate and metal salts (CFI-1) associated with a glycosidic protein (P14-16), which has a patent filed in the initial national phase of the PCT (Number: BR 1020170127680) by the innovation agency INOVA-UNICAMP. It acts as a biological response modifier, triggering immune system stimulation. The present study aimed to characterize the mechanisms of action of OncoTherad® (MRB-CFI-1) and its compounds (CFI-1 and P14-16). Sixty C57BL/6J mice obtained from CEMIB of UNICAMP were used for the development of the present study. Ten animals were assigned to the control group, and 50 animals were NMIBC chemically induced. After NMIBC induction, the animals were divided into 5 groups (n=10): Cancer, Cancer+MRB-CFI-1 (OncoTherad®), Cancer+P14-16, Cancer+CFI-1 and Cancer+BCG. After 6 weeks of treatment, the animals were euthanized, the bladder was collected and processed according to conventional protocols for histopathology, immunohistochemistry and western blotting. Histopathological results showed that after treatment with OncoTherad® tumor progression was reduced in 100% of the treated animals. Immunohistochemical analysis of components of the TLR2 and TLR4 pathways demonstrated that, unlike conventional treatment with BCG, OncoTherad® stimulated the non-canonical pathway, increasing the expression of TLR4, TRIF, IRF3 and inducing the activation of IFN. Animals treated with OncoTherad® showed reduced immunoreactivity of RANK and RANKL, which is indicative of a good prognosis with regard to the appearance of metastases. The PD1/PD-L1 checkpoint showed reduced expression after treatment with OncoTherad®, leading to infer that immunomodulation occurs due to a reduction in regulatory T lymphocytes, and consequently an increase in cytotoxic T lymphocytes, which can recognize tumor cells and eliminate them, which is confirmed by the decrease expression of FOXP3 in this treatment group compared to the Cancer group. OncoTherad® showed an important role in increasing the expression of P53 compared to conventional treatment with BCG, and may be one of the mechanisms of this immunotherapeutic to prevent cancer cell lines from multiplying. The organic (P14-16) and inorganic (CFI-1) compounds that make up OncoTherad® (MRB-CFI-1) did not show satisfactory reduction in tumor progression when evaluated separately, and showed distinct patterns of immunoreactivity for the analyzed pathways when compared to the Control and Cancer groups. However, when combined (MRB-CFI-1), they show promising results in immunomodulation and decreased progression of NMIBC.

**Keywords:** urinary bladder cancer; immunotherapy; OncoTherad; nanopharmaceutical; Toll-Like receptors; immunomodulator; lymphocytes Treg.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da profundidade de invasão tumoral da parede vesical, a
qual determina a Classificação Histológica do Câncer de Bexiga Urinária21
Figura 2: Via de sinalização dos TLRs28
Figura 3: Análise de XRD: Comparação entre P-MAPA e CFI-143
Figura 4: Análise de TGA: Comparação entre P-MAPA e CFI-144
Figura 5: Análise de DSC: Comparação entre P-MAPA e CFI-144
Figura 6: Camundongos C57Bl/ 6J em caixas de polietileno demonstrando o
enriquecimento ambiental48
Figura 7: Delineamento experimental50
Figura 8: Fotografias das Bexigas Urinárias representativas dos diferentes grupos
experimentais59
Figura 9: Histopatologia representativa das bexigas urinárias de camundongos dos
diferentes grupos experimentais61
Figura 10: Imunomarcação comparando a Via TLR2 (via canônica) entre os diferentes
grupos
Figura 11: Imunomarcação comparando a Via TLR4 (via não-canônica) entre os
diferentes grupos68
Figura 12: Imunomarcação das proteínas RANK/ RANKL, FOXP3 e PD-1/PD-L1 nos
diferentes grupos de tratamento72
Figura 13: Análise de Western Blotting de PD-1/PD-L1 da bexiga urinária dos
camundongos dos diferentes grupos de tratamento73
Figura 14: Gráfico das Categorias de Intensidade da Imunomarcação da proteína p53
comparativa entre os grupos76
Figura 15: Imunomarcação representativa da proteína p53 nos diferentes grupos de
tratamento77

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação TMN do Câncer de Bexiga (UICC - Union for Cancer Control,
2009)22
Tabela 2: Aspectos macroscópicos das bexigas urinárias e a incidência nos diferentes
grupos experimentais
Tabela 3: Porcentagem das alterações histológicas nas bexigas urinárias dos
diferentes grupos experimentais e Inibição da Progressão Tumoral (%)62
Tabela 4: Médias da intensidade de imunorreatividade para os diferentes antígenos
na bexiga urinária de camundongo C57BL / 6J dos diferentes grupos de tratamento.
Tabela 5: Média da intensidade de imunomarcação para os diferentes antígenos
(RANK, RANKL, FOXP3 e PD-1/PD-L1) comparando os diferentes grupos de
tratamento71
Tabela 6: Imunorreatividade total da proteína p53 nos diferentes grupos de
tratamento75
Tabela 7: Proporção de Núcleos p53 Positivos (%)

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA Análise de variância
- BCG Bacillus Calmette-Guérin
- CB Câncer de Bexiga Urinária
- CBNMI Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo
- Células NK Células Natural Killer
- CFI-1 Complexo Fosfato Inorgânico 1
- DAMPs Padrão Molecular Associado a Danos
- ECM Matriz Extracelular
- EMT Trânsito Epitélio-Mesenquimal
- ENU N-Etil-N-nitrosoureia
- EROs Espécies Reativas de Oxigênio
- FDA Food and Drug Administration
- FOXP3 Fator de Transcrição Forkhead
- IFN-γ Interferon Gamma
- IKK Kinase Kappa I
- IL-6 Interleucina-6
- INCA Instituto Nacional do Câncer
- INF-α Interferon Alfa
- IRF3 Fator Regulador de Intérferon 3
- iTreg Linfócito T regulatório Induzido
- MNU N-metil-N-nitrosurea
- MRB-CFI-1 Modulador de Resposta Biológica Complexo Fosfato Inorgânico 1
- MyD-88 Fator 88 de Diferenciação Mieloide
- NF-κB Fator de Transcrição Nuclear κB
- NO Óxido Nítrico
- OPG Osteoprotegerina
- P14-16 Proteína com Peso Molecular entre 14-16 kDa
- P53 Proteína Supressora Tumoral
- PD-1 Proteína de Morte Celular Programada 1

PD-L1 – Ligante de Morte Programado 1

P-MAPA – Agregado Polimérico Anidrídico Fosfolinoleato-Palmitoleato de Amônio e Magnésio

- PMNs Neutrófilos Polimorfonucleares
- RANK Fator Nuclear Ativador do Receptor KB
- RANKL Ligante do Fator Nuclear Ativador do Receptor кВ
- RTU Ressecção Transuretral
- T1 Tumor Confinado à Mucosa da Bexiga
- Ta Carcinoma Papilífero
- TAMs Macrófagos Associados ao Tumor
- TIRAP Adaptador de Proteína Contendo Domínio TIR
- Tis Carcinoma in situ
- TLR2 Receptor Toll-Like 2
- TLR4 Receptor Toll-Like 4
- TLRs Receptores Toll-Like
- TNF Fator de Necrose Tumoral
- TNF Fator de Necrose Tumoral
- TRAIL Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
- Treg Linfócito T regulatório
- TRIF ou TICAM1 Adaptador Contendo Domínio TIR Induzindo Interferon-β
- TUI Trato Urinário Inferior
- VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
1.1 A Bexiga Urinária16
1.2 O Câncer de Bexiga Urinária17
1.3 Modelo de Indução Química do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)
1.4 Sistema Imune e Câncer25
1.5 Biomarcador molecular p5336
1.6 Tratamento Primário do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo – Bacillus Calmette-Guerin (BCG)
1.7 Nova Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo: O Modulador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico I (MRB- CFI-1) - OncoTherad®
1.8 Justificativa
2. OBJETIVOS
2.1 Objetivo Geral47
2.2 Objetivos Específicos
3. MATERIAL E MÉTODOS48
3.1 Grupos experimentais: Indução do CBNMI e Tratamento
3.2 Análises Histopatológicas50
3.3 Análises Imuno-histoquímicas51
3.3.1 Via de sinalização dos Receptores Toll-Like (TLR2, TLR4, MyD88, IRF-3, IKK-α, NF-kB, TNF-α, TRIF, IFN-γ, IL-6)51
3.3.2 RANK/ RANKL, FOXP3, PD-1/PD-L1 e P5352
3.3.3 Análise da Intensidade de Imunorreatividade53
3.4 Proporção de Núcleos p53 positivos e Cálculo da Intensidade da imunorreatividade
3.5 Western Blotting: PD-1/PD-L1 e Ki-6754
3.6 Análises Estatísticas
4. RESULTADOS
4.1 Tratamento com OncoTherad® recuperou os aspectos macroscópicos das bexigas urinárias
4.2 O tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) inibiu a progressão tumoral em camundongos com CBNMI induzido quimicamente

4.3 OncoTherad® promoveu distinta ativação da via de receptores <i>Toll-Like</i> através do aumento da imunorreatividade da via-canônica e não-canônica63
4.4 O tratamento com OncoTherad® promoveu uma diminuição na imunorreatividade de RANK, do checkpoint PD-1/PD-L1 e de FOXP369
4.5 Os resultados de <i>Western Blotting</i> confirmam que o OncoTherad® é uma imunoterapia que modula o checkpoint imunológico PD-1/ PD-L172
4.6 OncoTherad aumentou os níveis de p53 em relação ao grupo Câncer
5. DISCUSSÃO
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS90
REFERÊNCIAS91
ANEXO 1 – Certificado de Bioética e Biossegurança109
ANEXO 2 – Declaração de Direitos Autorais110

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A Bexiga Urinária

A bexiga urinária e as vias urinárias armazenam a urina formada pelos rins e a conduzem para o exterior do corpo (Junqueira e Carneiro, 2013). Os cálices, a pelve renal, o ureter e a bexiga urinária possuem a mesma estrutura básica, embora a parede se torne gradualmente mais espessa no sentido da bexiga (Gomes e Hisano, 2010). É um órgão muscular oco, revestido internamente por epitélio transicional denominado urotélio, composto por uma camada de células superficiais (ou em guarda-chuva, altamente diferenciadas), intermediárias e basais (Junqueira e Carneiro, 2013).

Externamente ao urotélio encontram-se a lâmina própria e as camadas musculares lisa e adventícia (Junqueira e Carneiro, 2013). A lâmina própria é uma camada bem desenvolvida, ricamente vascularizada, formada basicamente de tecido conjuntivo com abundância de fibras elásticas. A camada muscular própria da bexiga (músculo detrusor) é constituída por fibras musculares lisas que formam feixes sem orientação definida, ramificam-se e reúnem-se livremente, mudando de orientação e de profundidade na parede da bexiga e entrelaçando-se com outros feixes. Esse arranjo sob a forma de malha complexa, sem formar camadas distintas, permite que o detrusor possa contrair-se harmonicamente, comprimindo a urina em direção à uretra proximal durante a micção. (Gomes e Hisano, 2010) O detrusor pode ser dividido em duas partes com base nas diferenças regionais de sua inervação simpática: 1) a parte localizada acima dos orifícios ureterais, denominada corpo vesical, que compreende sua maior parte e, 2) a base, que incorpora o trígono e o colo vesical (Gomes e Hisano, 2010).

A bexiga funciona como reservatório para armazenamento e eliminação periódica da urina. Para que essas funções ocorram adequadamente, é necessário que a musculatura lisa vesical (detrusor) relaxe e haja aumento coordenado do tônus esfincteriano uretral durante a fase de enchimento da bexiga – e o oposto durante a micção. A coordenação das atividades da bexiga e do esfíncter uretral envolve complexa interação entre os sistemas nervosos central e periférico e os fatores regulatórios locais, e é mediada por vários neurotransmissores. As propriedades

17

miogênicas e viscoelásticas vesical e uretral também são muito importantes para manutenção da função adequada de reservatório da bexiga (Drake, 2007).

O funcionamento da bexiga é coordenado em diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC), localizados na medula, na ponte e nos centros superiores por meio de influências neurológicas excitatórias e inibitórias que se dirigem aos órgãos do trato urinário inferior (TUI – bexiga, aparelho esfincteriano e uretra) e da aferência sensitiva desses órgãos. Perifericamente, o TUI é inervado por três tipos de fibras: parassimpáticas, simpáticas e somáticas (Blok, 2002). A micção é coordenada em nível do tronco encefálico, especificamente na substância pontinomesencefálica, denominado centro pontino da micção (CPM), que é a via final comum para motoneurônios vesical, localizados na medula espinhal (Blok, 2002). Em circunstâncias normais, a micção depende de um reflexo espino-bulbo-espinal liberado pelo CPM que recebe influências, na maior parte inibitórias, do córtex cerebral, do cerebelo, dos gânglios da base, do tálamo e do hipotálamo (influências suprapontinas) (Blok, 2002).

O tamanho da bexiga, forma e relações dependem do sexo, idade e quantidade de urina. Localiza-se na pelve, sobre o púbis e assoalho pélvico. Durante seu enchimento atinge o abdome podendo chegar até o umbigo. Na mulher, reflete-se sobre o útero, e no homem, reflete-se sobre o reto (Dangelo e Fattini, 2002). Em um adulto, a bexiga é capaz de armazenar cerca de 400 a 800 mL de urina. Já no roedor, localiza-se na região dorso-caudal, apresenta diâmetro de aproximadamente 4 mm, e sua capacidade de armazenamento é cerca de 1 ml (ratos) e 0,15 ml (camundongos) (Reis, et al., 2011).

Todos os órgãos do trato urogenital são sedes potenciais de tumores malignos. A incidência e o tipo variam de órgão para órgão, sendo o câncer de bexiga urinária (CB) a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (Siegel et al., 2012; *American Cancer Society*, 2021)

### 1.2 O Câncer de Bexiga Urinária

O câncer resulta na perda da homeostase, mediada por alterações nas formas

de comunicação intra, extra e intercelular, que desregulam o equilíbrio estabelecido entre proliferação, diferenciação, apoptose e adaptação celular (Troski e Ruch, 1998). É uma doença multifatorial, de efeito combinado de fatores genéticos e ambientais. Essa síndrome foi considerada um problema de saúde pública, definido pela Política Nacional de Atenção Oncológica, por meio da portaria 2439, publicada em dezembro de 2005. Culturalmente, o câncer é uma das doenças crônico-degenerativas mais estigmatizadas negativamente pela população, é associado a dor, ao sofrimento, mudanças na imagem corporal e à morte. E mesmo que os avanços na medicina permitam diagnóstico precoces e tratamentos, o medo do câncer permanece na sociedade (Holland, 1990).

O câncer de bexiga urinária é a segunda neoplasia mais comum do trato urinário, e o nono tipo mais incidente em nível mundial (Siegel et al., 2012; Antoni et al., 2017; INCA, 2020; Jahrreiss et al., 2020; *American Cancer Society*, 2021). De acordo com as estatísticas do Instituto Nacional de Câncer, no Brasil estima-se que em 2020 foram 10.640 novos casos, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres (INCA, 2020) e, de acordo com o Atlas de Mortalidade por Câncer, o número de mortes por câncer de bexiga chega a aproximadamente 58% em homens e 69% em mulheres (Atlas de Mortalidade por Câncer, 2015).De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, as estimativas para o câncer de bexiga nos Estados Unidos em 2021 são de aproximadamente 83.730 novos casos (cerca de 64.280 em homens e 19.400 em mulheres) e 17.200 mortes (12.260 em homens e 4.940 em mulheres) (*American Cancer Society*, 2021).

Pessoas idosas tem maior probabilidade de desenvolver câncer de bexiga, cerca de 9 em cada 10 pessoas diagnosticadas estão acima de 55 anos de idade. Porém, outros fatores como raça, tabagismo e exposição a compostos químicos aumentam o risco de sua ocorrência. O tabagismo está associado à doença em cerca de 50-70% dos casos (Kispert et al., 2019; Pezzuto et al., 2019; Jahrreiss et al., 2020). O risco é maior para o Tabaco preto, e aumenta com o número de cigarros fumados diariamente e o número de anos, e também com a inalação (Samanic et al., 2006). O cigarro possui dezenas de substâncias tóxicas, dentre elas aminas aromáticas e compostos N-nitrosos análogos do MNU (N-metil-N-nitrosouréia), um potente carcinógeno.

Cerca de 20 a 27% dos casos de câncer de bexiga estão relacionados à exposição ocupacional, em especial entre trabalhadores que ficam expostos a compostos químicos (Rink et al., 2015; Jahrreiss et al., 2020). Dentre esses produtos destacam-se as aminas aromáticas, benzeno, benzidina, cromo/cromatos, especialmente em indústrias químicas; fumo e poeira de metais, agrotóxicos, óleos, petróleo, tintas, 2-naftalina e 4-aminobifenil, os quais contribuem para o aparecimento da doença (Silverman et al., 2006; Rota et al., 2014). Nos últimos anos tem sido reportado aumento dos casos entre trabalhadores de diversos setores: agricultura, construção, fundição, extração de óleos e gorduras, mineração, siderurgia; indústria têxtil e de alimentos. Entre os trabalhadores que ficam expostos ao alumínio, borracha e plásticos, tinturas, pode-se citar os cabeleireiros e barbeiros, maquinistas, motorista de caminhão e de locomotiva, pintor, trabalhador de ferrovias, trabalho no forno de coque e tecelão (Reulen et al., 2008; Rink et al., 2015; Jahrreiss et al., 2020).

A infecção por *Schistosoma haematobium*, um verme parasita, pertencente ao filo Platyhelminthes, endêmico de países mediterrâneos como o Egito afeta frequentemente as vias urinárias, ocasionando hematúria (Zeegers et al., 2000; Poon et al., 2015; Rosenquist e Grollman, 2016). Em fases terminais, causa insuficiência renal por obstrução urinária e, em último caso, pode causar neoplasias da bexiga (Mascarenhas e Castro, 2011; Ishida et al., 2018; Nesi et al., 2019; Jahrreiss et al., 2020).Substâncias como o arsênio, que podem estar presentes em águas de abastecimento; o ácido aristolóquico presente em muitas plantas de uso medicinal e a pioglitazona presente em fármacos para tratamento de diabetes, estão associados como um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga urinária (Poon et al., 2015; Rosenquist e Grollman, 2016). Indivíduos com algumas síndromes genéticas tem maior predisposição ao desenvolvimento de carcinoma urotelial, um exemplo é a síndrome de Lynch (Carlo et al., 2019).

De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, a ingestão reduzida de líquidos pode ser um fator de risco para o câncer de bexiga, pois um indivíduo que ingere quantidades elevadas de líquidos, principalmente água, tende a eliminar substâncias químicas mais rapidamente, levando em consideração que este tenderá a esvaziar a bexiga com mais frequência (*American Cancer Society*, 2016; 2021).

Em geral, o câncer de bexiga é cerca de três a quatro vezes mais comum em

homens comparado à incidência em mulheres (Nezos et al., 2009). Por outro lado, a sobrevida das mulheres é pior com esse tipo de tumor. Especula-se que a alta agressividade desse câncer em mulheres é decorrente do desbalanço hormonal (menopausa), o qual surge a partir da quinta década de vida. 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).

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

Mais de 70% da sua incidência é superficial (pTis, pTa e pT1), tumor nãomúsculo invasivo (CBNMI), e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Askeland et al., 2012). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Askeland et al., 2012). Tratamentos para o CBNMI consistem na RTU, na qual é realizada a retirada do tumor por cateterismo intravesical (cistoscópio), seguida por instilação de agentes quimioterápicos ou imunoterápicos, de forma contínua por aproximadamente 1 a 3 anos, e os pacientes necessitam fazer um controle periódico, através de cistoscopias, com a finalidade de vigiar a recorrência tumoral (Brausi et al., 2011; Klotz e Brausi, 2014).

Já os diagnósticos de câncer de bexiga músculo invasivos, requerem uma remoção cirúrgica da bexiga, por um procedimento chamado cistectomia parcial, quando ocorre remoção de apenas uma porção da bexiga ou cistectomia radical, com remoção total da bexiga e possível reconstrução; ou radioterapia, acompanhada ou não de quimioterapia (Brausi et al., 2011).



Figura 1: Representação da profundidade de invasão tumoral da parede vesical, a qual determina a Classificação Histológica do Câncer de Bexiga Urinária.

Figura modificada (Landry, 2012). Na figura estão representadas as lesões por profundidade de invasão tumoral da parede vesical. As setas verdes apontam os cânceres não-musculo invasivos, que correspondem a 75% dos casos de câncer de bexiga (pTis, pTa e pT1); e os músculo invasivos são apontados pelas setas vermelhas, e correspondem a 25% dos casos de cancer de bexiga (pT2a, pT2b, pT3a, pT3b e pT4).

**Tabela 1:** Classificação TMN do Câncer de Bexiga (UICC - *Union for Cancer Control*, 2009).

CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE BEXIGA		
Tumor primário: T		
ТХ	Tumor primário não pode ser avaliado	
ТО	Nenhuma evidência de Tumor primária	
Та	Carcinoma papilar não invasivo (restrito a mucosa)	
Tis	Carcinoma in situ	
T1	Tumor com invasão subepitelial (invasão da lâmina própria)	
T2: Tumor com invasão da musculatura própria		
pT2a	Superficial (metade interna)	
pT2b	Profunda (metade externa)	
T3: Tumor invade tecido perivesical		
рТ3а	Microscopicamente	
pT3b	Macroscopicamente (massa extravesical)	
T4: Tumor invade qualquer órgão adjacente		
pT4a	Tumor invade próstata, útero ou vagina	
pT4B	Tumor invade a parede pélvica-abdominal	
Linfonodos Regionais (N)		
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados	
NO	Nenhuma metástase para linfonodo regional	
N1	Metástase linfonodos ≤ 2cm	
N2	Metástase linfonodos ≤ 5cm	
N3	Metástase linfonodos ≥ 5cm	
Metástases a Distância (M)		
MX	Metástases a distância não podem ser avaliadas	
MO	Nenhuma metástase a distância	
M1	Metástases a distância	

O câncer de bexiga é um sério problema de saúde pública, em prevalência, mortalidade, efeitos na qualidade de vida dos indivíduos e de suas famílias, e em custo

econômico (Brausi et al., 2011). Hoje o maior desafio do INCA, é ampliar no Brasil as ações de promoção da saúde, prevenção e diagnóstico precoce para reduzir os índices de incidência e mortalidade do câncer, além de propiciar qualidade de vida ao paciente (INCA, 2020). É importante ressaltar que cerca de 50% dos cânceres de bexiga poderiam ser prevenidos (Brausi et al., 2011).

### 1.3 Modelo de Indução Química do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Na ciência médica permitem o melhor conhecimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, da ação de medicamentos ou dos efeitos das intervenções cirúrgicas (Ferreira et al., 2005). Para investigar o CBNMI de forma mais aprofundada, compreender os efeitos de medicamentos já existentes no mercado, e buscar o desenvolvimento de novas terapias e tratamentos para o câncer de bexiga urinária, diversos estudos utilizam tais modelos (ratos e camundongos) (Reis et al., 2009; Reis et al., 2010; Fávaro et al., 2012; Dias et al., 2016; Garcia et al., 2016).

Comprovou-se que 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 e Wakefield utilizaram 4 doses de N-metil-N-nitrosureia (MNU) para rápida indução do CBNMI em ratos, demonstrando que este é um carcinógeno completo (Hicks e Wakefield, 1972). O MNU pode atuar como iniciador e promotor da neoplasia, podendo causar persistente metilação do DNA (Steinberg et al., 1990). Estudos com animais pré-tratados com MNU confirmaram que as células tumorais. preferencialmente, se implantam na superfície urotelial alterada (Weldon e Soloway, 1975; Soloway et al., 1983).

A carcinogênese urotelial induzida com MNU em ratos é semelhante à carcinogênese humana, pois envolve o efeito de agentes ambientais (o mesmo carcinógeno presente no cigarro de tabaco) num sistema teste geneticamente

susceptível (ratos *Fischer* 344 ou camundongos C57BL/6J). Além disso, esse tipo de procedimento induz uma sequência de alterações morfológicas, iniciando com hiperplasia simples seguida de hiperplasia nodular e papilar, progredindo posteriormente para papiloma e, ocasionalmente, carcinomas não-invasivos e, finalmente, a neoplasias invasivas (Cohen, 2002; Oliveira et al., 2006; Reis et al., 2009; Reis et al., 2010; Fávaro et al., 2012; Reis et al., 2012; Garcia et al., 2015; Dias et al., 2016; Garcia et al., 2016).

Os experimentos com CBNMI realizados por nosso grupo de pesquisa utilizaram, a princípio, o modelo animal (ratos *Fischer* 344 ou camundongos C57BL/6) de indução química com MNU. Porém, no ano de 2017 quando o N-Nitroso-N-methylurea (MNU –N1517 Sigma Aldrich) foi descontinuado, o N-Nitroso-N-ethylurea (N3385 ISOPAC®; NEU) passou a ser usado em ambos os modelos experimentais, demonstrando a mesma eficácia que o MNU. Likhachev e seu grupo de pesquisa em um experimento com hamsters Syrian Golden, também demonstraram que tanto o MNU quanto o NEU (N-Nitroso-N-ethylurea) provocaram metilação no DNA em diversos tecidos, induzindo o câncer (Likhachev et al., 1983).

Portanto, o modelo animal induzido tanto com MNU, quanto com N-Nitroso-Nethylurea, apresenta vantagens particulares para os estudos da carcinogênese urogenital, a saber: são conhecidos por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica; reproduz 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; podem ser administrados por via intravesical em doses de pulso quantificáveis; possuem baixo custo reprodutível e utiliza um hospedeiro imunocompetente, o que é importante quando se estuda o tratamento com imunomoduladores, como por exemplo, o *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG); modelo de câncer mais controlado do que aqueles que usam carcinógenos na dieta ou na água potável (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2010; Reis et al., 2012; Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015; Dias et al., 2016; Garcia et al., 2016).

#### 1.4 Sistema Imune e Câncer

O sistema imunológico foi identificado como um fator de proteção durante doenças infecciosas há mais de um século, e é comumente definido como um mecanismo de defesa (Retirf e Cilliers, 1998; Sattler, 2017). No entanto, a defesa do hospedeiro é apenas uma manifestação da função geral desse sistema na manutenção da homeostase tecidual e em sua integridade (Sattler, 2017). De fato, o sistema imune é parte integrante de processos fisiológicos fundamentais, tais como desenvolvimento, reprodução e cicatrização de feridas, e a importante comunicação entre o sistema imune e outros sistemas do corpo como o sistema nervoso central, o sistema cardiovascular, e também com o metabolismo dos indivíduos, é bastante evidente (Sattler, 2017).

No século XIX, Rudolf Virchow mostrou as primeiras evidências da presença de células inflamatórias em tumores, sugerindo uma possível associação entre inflamação e câncer. Entretanto, este assunto não foi explorado naquela época. Esse processo foi novamente investigado, indicando que a inflamação possui um papel crítico na carcinogênese (Karin, 2006). O microambiente tumoral contém células da imunidade inata (incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killers* ou NK) e do sistema imune adaptativo (linfócitos B e T), além de células tumorais e o estroma circunjacente (o qual consiste de fibroblastos, células endoteliais e células mesenquimais) (De Visser et al., 2006). Essas diversas células se comunicam por meio de contato direto e também pela produção de citocinas e quimiocinas, que atuam no microambiente tumoral. Logo, há expressão de vários mediadores e moduladores imunológicos, que estão ativados no microambiente tumoral (Smyth et al., 2006; Karin, 2007)

Nesse aspecto, os receptores *Toll-like* (TLRs) pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (Kumar et al., 2011; Satoh e Akira, 2016). Os TLRs também têm um papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (Galli et al., 2010; Satoh e Akira, 2016). TLRs que reconhecem lipídios e proteínas ligantes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) estão expressos na membrana plasmática, enquanto TLRs que detectam ácidos nucleicos virais (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9)

estão localizados em compartimentos lisossomais (Takeda e Akira, 2004; Akira e Takeda, 2004; Galli et al., 2010; Zhao et al., 2014; Satoh e Akira, 2016).

TLRs são amplamente distribuídos em células do sistema imunológico e caracterizados como sensores imunológicos de patógenos invasores. As vias de sinalização são desencadeadas pela detecção desses patógenos, iniciando a resposta imune inata (Xie et al., 2009). Os TLRs são reconhecidos por detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) incluindo vírus, bactérias, fungos e parasitas (Liew et al., 2005). Até o momento, foram identificados 11 receptores da família dos TLRs com a característica de possuírem um domínio extracelular, constituindo múltiplas repetições ricas em leucina, um domínio transmembrana e um domínio intracelular (Akira e Satoh, 2003)

A sinalização dos TLRs induz a ativação dos genes de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral Alfa), IL-6 (Interleucina 6) e IL-1 $\beta$  (Interleucina 1 $\beta$ ), bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador (Akira e Takeda, 2004; Galli et al., 2010; Satoh e Akira, 2016).

A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear kB (NF-κB), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs), proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs) e os fatores regulatórios de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (Takeda e Akira, 2004; Akira e Takeda, 2004; Satoh e Akira, 2016).

Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF-kB e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF-α e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Galli et al., 2010; Satoh e Akira, 2016). A função clássica dos TLRs consiste no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados com posterior indução de respostas imunes adaptativas (Akira e Takeda,

2004; Galli et al., 2010; Satoh e Akira, 2016). Sua ativação na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), as quais desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (Satoh e Akira, 2016).

As moléculas adaptadoras envolvidas na sinalização dos TLRs são: fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), TIRAP, TRIF e TRAM (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2016). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção do TLR3, e ativa NF-ĸB e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas inflamatórias (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2016). TRAM e TIRAP são moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e pelos TLRs 2 e 4 para recrutar MyD88, respectivamente (**Figura 2**) (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Takeda e duas formas: via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de interferon (Akira e Takeda, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Takeda e Akira, 2004; Satoh e Akira, 2004; Takeda e Akir

Evidências contraditórias apontam que sob certas condições, a inflamação promove carcinogênese, enquanto em outras ela exerce efeitos antitumorais. Este fato pode ser explicado pela diferença de intensidade e da natureza da resposta inflamatória (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Na maioria dos casos, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores que estimulam o reparo tecidual e a proliferação e sobrevivência da célula neoplásica (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010).

No entanto, se a resposta inflamatória se desenvolve em inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado com consequente regressão do tumor (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Considerando os diversos elementos que controlam os processos neoplásicos, um importante papel é atribuído aos membros da superfamília de citocinas (Ben-Baruch, 2006). Citocinas expressas pelas células tumorais e células do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tumor através da regulação da migração de diferentes subtipos de leucócitos (Ben-

Baruch, 2006). A proporção relativa de cada tipo de célula de defesa no interior do tumor, por exemplo, macrófagos, células T, células NK, células dendríticas, ou outros subtipos de leucócito, determina em grande parte o perfil imunológico local (Allavena et al., 2008). Em particular, células T CD8 e alguns tipos de células do sistema imunológico inato, como as células NK, podem inibir o crescimento tumoral (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010).





Fonte: Takeda e Akira, 2004.

Agonistas dos TLRs são alvos de intensas pesquisas para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para os diferentes cânceres, incluindo o CBNMI (Akira e Takeda, 2004; Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015). A administração desses agonistas exerceu fortes efeitos antineoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos e em humanos (Rakoff-Nahoum e Medzhitov, 2009). A ativação dos TLRs pode causar a regressão do tumor através do aumento da permeabilidade vascular e por meio do recrutamento de leucócitos, os quais determinam a lise das células neoplásicas pelas células natural killer (NK) e células T citotóxicas (Rakoff-

Nahoum e Medzhitov, 2009). Assim, um dos efeitos mais promissores da estimulação dos TLRs por agonistas específicos na terapia do câncer é a ativação do sistema imune adaptativo (Krieg, 2007; Paone et al., 2008; Galli et al., 2010).

Sabe-se que o microambiente tumoral é composto por uma complexa rede interconectada, que inclui fatores solúveis, como citocinas e componentes da matriz extracelular, os quais interagem com fibroblastos, células endoteliais, células imunes e vários tipos celulares específicos, dependendo da localização das células tumorais. Esta diversidade define, o que alguns autores chamaram de "nichos" específicos (por exemplo, nichos vasculares, imunes, ósseos) envolvidos no crescimento do tumor e no processo metastático (Molofsky et al., 2004; Renema et al., 2016). Os quais comunicam-se em conjunto por comunicações intercelulares diretas e/ ou de maneira autócrina/ parácrina/ endócrina, envolvendo citocinas e fatores de crescimento.

Nesse sentido, pode-se citar glicoproteínas, como o RANKL (ligante do fator nuclear ativador do receptor- $\kappa$ B) e seu receptor RANK (fator nuclear ativador do receptor  $\kappa$ B), membros das superfamílias TNF (Fator de Necrose Tumoral) e TNFR, os quais tem estimulado o interesse da comunidade científica, devido ao fato de RANK ser frequentemente expresso por células tumorais, em contraste com o RANKL, que é comumente detectado no microambiente tumoral e, juntos, participam de todas as etapas do desenvolvimento do câncer (Renema et al., 2016).

A tríade molecular envolvendo o sistema RANK/ RANKL/ OPG (osteoprotegerina) tem sido comumente estudada por influenciar vários processos fisiológicos e patológicos em todo o corpo, os quais incluem remodelação óssea, desenvolvimento da glândula mamária, desenvolvimento e migração de células tumorais e modulação da imunidade adaptativa (Wong et al., 1998; Hofbauer e Heufelder, 2001; Boyce e Xing, 2007; Cheng e Fong, 2014; Ming et al. 2020). O papel deste sistema de sinalização tem sido bem enfatizado no osso, onde a sinalização RANKL/ RANK medeia a osteoclastogênese e reabsorção óssea via sinalização parácrina entre osteoblastos (RANKL) e osteoclastos (RANK) (Ming et al. 2020).

Na superfície dos osteoclastos encontra-se o RANK, responsável pela regulação de vários pontos do ciclo celular da célula como ativação, diferenciação e sobrevivência da célula madura (Lee et al., 2010) através do seu ligante, o RANKL,

proteína transmembrana da família do TNF (Fator de Necrose Tumoral) (Gartrell e Saad, 2014), a qual é expressa principalmente por osteócitos, e também por osteoblastos e outras células estromais, como por exemplo, os linfócitos T. O RANKL possui três isoformas, das quais duas apresentam domínios transmembranares que requerem contato célula-célula (RANKL 1 e 2), e uma isoforma solúvel livre, cuja produção depende da ação da enzima conversora do TNF (TACE – *Tumor necrosis factor-α-converting enzyme*) ou pela ação de MMPs que clivam o RANKL transmembranar – o RANKL 3 (Sottnik e Keller, 2013). O OPG produzido pelos osteoblastos e células estromais atua como um receptor para o RANKL solúvel e, portanto, impede a diferenciação e ativação dos osteoclastos ao interferir na interação entre RANKL e RANK (Hofbauer e Heufelder, 2001).

Porém, a expressão de RANK/ RANKL não se restringe a tecidos saudáveis e numerosos estudos demonstraram sua expressão em tecidos neoplásicos. Essa ampla distribuição fortalece a hipótese de seu papel fundamental no processo oncogênico. Estudos mostraram que uma elevada porcentagem de células tumorais expressa RANK em vários níveis (Satini et al., 2011a; 2011b). De fato, 89% de todos os carcinomas avaliados por Satini e seus colaboradores apresentam imunomarcação positiva para RANK e aproximadamente 60% dos casos apresentaram mais de 50% de células neoplásicas positivas (Satini et al., 2011b).

Curiosamente, a expressão de RANK em células neoplásicas é um marcador de mau prognóstico, como demonstrado no câncer de mama (Park et al., 2014; Pfitzner et al., 2014). Similarmente aos cânceres de próstata, Pfitzner e colaboradores demonstraram que a expressão mais alta de RANK no tumor primário de mama estava associada à maior sensibilidade à quimioterapia, mas também a um maior risco de recidiva e morte, apesar dessa maior sensibilidade (Pfitzner et al., 2014). Em um trabalho complementar realizado por Palafox e colaboradores (2012), foi demonstrado que o eixo RANKL/ RANK foi pró-ativo na transição epitelial-mesenquimal (EMT), e promoveu simultaneamente migração celular com neovascularização e sua expressão foi significativamente associada a tumores metastáticos. A expressão de RANK também foi descrita como sendo preditiva de mau prognóstico em pacientes com metástase óssea, mas não em pacientes com metástases viscerais (Zhang et al., 2012). Recentemente, foi descrito um caso clínico interessante de um paciente com osteossarcoma tratado com Sorafenibe e Denosumabe (Cathomas et al., 2015). RANK e RANKL foram expressos pelas células tumorais e os autores observaram remissão metabólica completa por mais de 18 meses, reforçando o valor terapêutico potencial de bloquear a sinalização RANK/ RANKL no osteossarcoma (Cathomas et al., 2015). Enquanto RANK é expresso por vários tipos de células tumorais, o seu ligante pode ser produzido por células tumorais ou pelo seu ambiente. Consequentemente, RANKL pode então agir de maneira parácrina ou autócrina sobre as células tumorais.

Outros estudos revelaram que a sinalização de RANK/ RANKL promove o estágio inicial no desenvolvimento do câncer de mama, levando à diminuição da diferenciação celular - "*stemness*" – e EMT nas células epiteliais mamárias (Schramek et al., 2010; Hanada et al., 2011). Um processo semelhante foi confirmado em carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (Yamada et al., 2011) e em carcinoma de endométrio (Liu et al., 2016). A expressão de RANKL foi associada à EMT e parece ser um novo marcador para EMT em células de câncer de próstata (Odero-Marah et al., 2008).

Jones e colaboradores (2016) forneceram a primeira evidência de uma atividade quimioatrativa para RANKL. Esses autores demonstraram que o RANKL produzido por osteoblastos e células estromais da medula óssea atrai células tumorais que expressam RANK, induzindo sua migração (Jones et al., 2016). Esse mecanismo parece ser relativamente universal e foi observado em câncer de próstata (Mori et al., 2006; Chawla et al., 2013; Li et al., 2014), câncer de mama (Chawla et al., 2013), câncer de cólon (Van Poznak et al., 2006), melanoma (Chawla et al., 2013), carcinoma oral de células escamosas (Shin et al., 2011), câncer de pulmão (Chen et al., 2011), hepatocarcinoma (Song et al., 2011), câncer endometrial (Wang et al., 2015), osteossarcoma (Beristain et al., 2012; Golden et al., 2015) e câncer renal (Mikami et al., 2009). A migração induzida por RANKL está associada a cascatas de sinalização específicas, especialmente a ativação das vias da MAP quinase. Portanto, o eixo RANKL/ RANK regula a migração de células tumorais e o RANKL atua como um agente quimioatrativo nas células que expressam um dos seus receptores.

Além de seus efeitos diretos sobre as células tumorais, o RANKL é capaz de modular o microambiente tumoral, em particular na neovascularização. Os vasos sanguíneos são importantes para as células tumorais, pois fornecem grandes quantidades de nutrientes e são usados como principal meio de migração dessas células para outros tecidos, de modo a invadir órgãos distantes. A expressão de RANK foi detectada em células endoteliais e, interagindo com este receptor, o RANKL impacta o processo angiogênico tanto por estimular a angiogênese através de um mecanismo dependente de Src e fosfolipase C (Kim et al., 2002; Min et al., 2003), como aumentar a sobrevivência celular de maneira dependente de PI3k (phosphatidylinositol 3-kinase) / Akt (protein kinase). (Kim et al., 2003). O RANKL também induziu a proliferação de precursores de células endoteliais e a neovascularização (Benslimane et al., 2011). Este fenômeno é exacerbado pelo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que é frequentemente secretado pelas células tumorais e que regula positivamente a expressão de RANKL das células endoteliais por uma regulação positiva da expressão de RANK e um aumento da permeabilidade vascular (Min et al., 2007).

O RANKL influencia o microambiente das células tumorais atuando na imunidade local. Seu principal papel no sistema imunológico foi inicialmente identificado em camundongos *knockout* para RANKL, nos quais o desenvolvimento de órgãos linfóides secundários estava comprometido, especialmente os linfonodos (Kong et al., 1999; Mueller et al., 2012), mas também a nível "central", onde a maturação das células do timo, necessárias para o desenvolvimento de células T, foram afetadas (Akiyama et al., 2008; Akiyama et al., 2013). Também está envolvido na modulação da resposta imune induzindo proliferação de células T (Anderson et al., 1997) e sobrevivência de células dendríticas (Wong et al., 1997). As células T ativadas como resultado da expressão de RANKL estimulam as células dendríticas, expressando RANK, para aumentar sua sobrevivência e, assim, aumentar a resposta de memória das células T (Anderson et al., 1997). Mais recentemente, foi demonstrado que o bloqueio de RANKL pode resgatar células T específicas para o melanoma através da deleção tímica, e aumentar a resposta imune antitumoral (Khan et al., 2014).

Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) acumulam-se no microambiente tumoral e, dependendo do seu fenótipo M2 ou M1, desempenham um papel no

crescimento do tumor, na angiogênese e na metástase (Cook et al., 2013). RANK está presente na membrana celular de monócitos/ macrófagos e RANKL atua como um fator quimioatrativo para essas células (Breuil et al., 2003). Os macrófagos M2 que expressam principalmente RANK estão fortemente associados ao processo angiogênico (Kambayashi et al., 2012). A sinalização de RANK/ RANKL nos macrófagos M2 modula a produção de quimiocinas, promovendo a proliferação de linfócitos T regulatórios (Treg) em favor de um ambiente imunossupressor (Fujimura et al., 2015). No carcinoma da mama, o RANKL é produzido principalmente por linfócitos Treg (linfócitos T CD4+ CD25+ que expressam Foxp3). Neste contexto, um ciclo vicioso é estabelecido entre TAMs, Treg e células tumorais, resultando no crescimento do tumor, a disseminação de células cancerígenas e amplificação do processo metastático (Tan et al., 2011). Os linfócitos T parecem ser a principal fonte de RANKL na tumorigênese. Se os linfócitos T produtores de RANKL estão envolvidos na etapa inicial do processo metastático ou não, os linfócitos T induzem um ambiente permissivo iniciando o nicho pré-metastático (Monteiro et al., 2013).

Além da regulação de muitas funções biológicas em todo o corpo, o sistema RANK/ RANKL tem um papel fundamental na fisiopatologia de vários distúrbios (Sisay, et al., 2007). Considerando o papel desse sistema no desenvolvimento de células tumorais e metástases, os cientistas estão empenhados em descobrir agentes terapêuticos direcionados a estas proteínas relacionadas ao TNF (RANK, RANKL e OPG) e suas vias de sinalização, para melhor tratamento do câncer e também da osteoporose (osteólise óssea).

Na última década, o tratamento de tumores avançados vem sendo revolucionado devido ao desenvolvimento de novas modalidades imunoterapêuticas, em especial os inibidores de *checkpoints* imunológicos (Wei et al., 2018). O Ipilimumab é um anticorpo monoclonal contra o receptor proteína 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), que por sua vez trata-se de um co-receptor inibitório dos receptores de células T (TCR). Quando ocorre a co-estimulação do TCR e do CTLA-4, o linfócito T desenvolve tolerância em relação ao antígeno apresentado. Já quando o CTLA-4 é inibido pelo Ipilimumab, o TCR pode ser estimulado sem a co-estimulação inibitória e a resposta imune ao antígeno em questão é exacerbada (Weber, 2009; Robert et al., 2011; Tarhini, 2013; Schadendorf et al., 2015). Após o sucesso do Ipilimumab no tratamento de melanoma metastático, outros inibidores de *checkpoints* 

foram desenvolvidos, focando na inibição do receptor de morte celular programada 1 (PD-1) ou de seu ligante (PDL-1) (Patnaik et al., 2015; Larkin et al., 2015; Chang et al., 2016; Rosenberg et al., 2016; Kang et al., 2017). Trata-se também de um receptor inibitório, cuja estimulação resulta em inativação de linfócitos T já sensibilizados contra determinado antígeno. Já estão disponíveis para a prática clínica anticorpos monoclonais contra o PD-1, tais como Nivolumab (Larkin et al., 2015) e Pembrolizumab (Patnaik et al., 2015; Sullivan e Flaherty, 2015; Kang et al., 2017); ou contra o ligante desse receptor (PDL-1), tais como Durvalumab (Antonia et al., 2018), Avelumab (Patel et al., 2018) e Atezolizumab (Rosenberg et al., 2016).

Nesse sentido, torna-se importante estudar também a expressão de PD-L1 e PD-1, que formam um sistema complexo de receptores e ligantes envolvidos no controle da ativação de células T. Em tecidos normais, PD-L1 é expresso em células T, células B, células dendríticas, macrófagos, células-tronco mesenquimais, mastócitos e outras células não-hematopoiéticas (Wang et al., 2016). PD-L1 também é expresso por tumores, auxiliando os mesmos na evasão de sua detecção e eliminação pelo sistema imune do hospedeiro (Wang et al., 2016; Yu et al., 2016; Diggs et al., 2017). O conhecimento em relação a via PD-1/ PD-L1 é relativamente recente. O PD-1 foi identificado em 1991, e somente alguns anos mais tarde, identificou-se o PD-L1 (Keir et al., 2009). O ligante de morte programada 1 (PD-L1) é um membro da superfamília B7. É uma proteína transmembrana de 40 kDa, codificada pelo gene CD274 localizado no cromossomo 9 (Butti et al., 2008).

As células T reguladoras (Tregs), um subconjunto único de células T auxiliares CD4+, caracterizadas pelo fenótipo CD4+ CD25+, podem suprimir a proliferação e a secreção de citocinas dos linfócitos T efetores através da imunorregulação. O FOXP3, um fator de transcrição *Forkhead Box P3*, parece funcionar como um regulador principal no desenvolvimento e controle de Tregs (Yagi et al., 2004; Campbell e Ziegle, 2007), e é considerado como o marcador de superfície mais específico e confiável de Tregs (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003). FOXP3 é considerado um biomarcador e fator prognóstico para tumores malignos humanos (Schreiber, 2007). Estudos realizados com 1270 amostras tecidos, mostraram que a infiltração intratumoral por Tregs FOXP3+ foi altamente correlacionada com o subtipo intrínseco e revelou-se como um preditor prognóstico independente para pacientes com câncer de mama (Liu et al., 2011; 2012).

Evidências sugerem que PD-L1 desempenha um papel crucial na indução e manutenção de Tregs que leva ao aumento de Tregs no microambiente tumoral e estes Tregs induzidos (iTregs) inibem as respostas das células T ao tumor (Francisco et al., 2009; Ni et al., 2012). A ligação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e a infiltração de Tregs já foi avaliada em pacientes com carcinoma gástrico e colorretal e corroborou com seu efeito supressor na ativação e/ou proliferação de células T (Hou et al., 2014; Zhao et al., 2014; Geng et al., 2015). A ampla expressão do PD-L1 avaliada, retrospectivamente, em microambientes tumorais e sua relação com parâmetros clínicopatológicos conduziram os estudos desta via regulatória de sinalização como potencial alvo terapêutico antineoplásico (Zou e Chen, 2008; Homet-Moreno e Ribas, 2015).

A regulação positiva de PD-L1 tem sido descrita em várias malignidades e tem sido associado ao estado clínico-patológico de pacientes com tumores sólidos (Hamanishi et al., 2007; Chen et al., 2012; Droeser et al., 2013). Estudos prévios demonstraram que moléculas abundantes de PD-L1 eram expressas tanto por células tumorais quanto por células imunes infiltrantes e sua inibição resultava em uma resposta clínica duradoura em ensaios clínicos recentes de vários tumores sólidos (Hodi et al., 2010; Brahmer et al., 2012; Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014).

Recentemente, a expressão de PD-L1 tem sido estudada com o intuito de prever a resposta clínica à inibição de PD-L1, a fim de estimar quais pacientes podem se beneficiar da terapia (Herbst et al., 2014). No entanto, sua expressão e impacto no prognóstico de pacientes com câncer de mama é controversa nos relatos limitados (Ghebeh et al., 2006; Ghebeh et al., 2007; Muenst et al., 2014; Schalper et al., 2014). Entre as neoplasias humanas, a investigação da expressão imuno-histoquímica de PD-L1 está validada por estudos clínicos, e apresenta inegável valor preditivo de resposta às terapias anti-PD-1 disponíveis. Destacam-se os carcinomas de não-pequenas células de pulmão e carcinomas uroteliais da bexiga (Cree et al., 2016; Chae et al., 2016; Gandini et al., 2016; Kerr et al., 2016).Desde que análises iniciais em neoplasias de pulmão, ovário, rim e melanomas evidenciaram altos níveis de expressão de PD-L1 (Dong et al., 2002; Pardoll, 2012), estudos subsequentes sugeriram que seu status – independente de estratégias terapêuticas – pode estar relacionado a prognósticos oncológicos (Zou e Chen, 2008; Pardoll, 2012; Gatalica et al., 2014; Patel e Kurzrock, 2015; Diggs e Hsueh, 2017).

Frente ao exposto, reforça-se a importância da avaliação da expressão de PD-L1 e FOXP3 em neoplasias, uma vez que a detecção da proteína PD-L1 funciona como biomarcador analítico de resposta à terapia anti-PD-L1, e a expressão de FOXP3 marca a infiltração tumoral de linfócitos Treg, que inibem a ação de linfócitos T citotóxicos, os quais são importantes na detecção de células tumorais pelo sistema imune. Dessa forma, PD-L1 e FOXP3 estão sendo avaliados como potenciais biomarcadores imunes.

### 1.5 Biomarcador molecular p53

No que diz respeito a previsão de recorrência e progressão tumoral, biomarcadores moleculares como Ki-67, FGFR3 e p53 parecem ser promissores. Van Rhijn e colaboradores (2010) validaram a utilidade da graduação molecular como um fator prognóstico para prever resultados em pacientes com CBNMI. O painel de consenso internacional sobre citologia e marcadores de tumor de bexiga avaliou a utilidade prognóstica de marcadores moleculares para câncer de bexiga (Habuchi et al., 2005). Os marcadores moleculares foram classificados em seis grupos, ou seja, marcadores associados a microssatélites (FISH, LOH), proto-oncogenes / oncogenes (Her-2 / neu, H-Ras, BCL-2, MDM-2, FGFR-3, C -MYC), genes supressores de tumor (p53, Rb), reguladores do ciclo celular (p21, p27, Ki-67, Cyclin-D1, Cyclin-E), fatores relacionados à angiogênese (VEGF, COX-2, TSP- 1) e moléculas de adesão à matriz extracelular (E-caderina, MMPs, TIMPs, CD44, U-PA). O painel concluiu que, embora certos biomarcadores, como Ki-67 e p53, pareçam ser promissores na previsão de recorrência e progressão em pacientes com câncer de bexiga, os dados ainda são heterogêneos, necessitando de mais estudos (Habuchi et al., 2005).

Em 1979, quando a proteína p53 foi descoberta, os pesquisadores sugeriram que ela era codificada por um oncogene, até que pesquisas realizadas posteriormente demonstraram que aquela proteína descoberta era produzida pelo gene P53 mutado (Linzer e Levie, 1974). Quando o gene P53 selvagem foi descrito, a função da proteína p53 normal foi demonstrada, e os pesquisadores viram que ela era capaz de inibir a transformação maligna de células e o crescimento de linhagens defeituosas (Linzer e Levie, 1974; Finlay et al., 1989). E, portanto, P53 passou a ser considerado o mais
importante gene supressor de tumores, pois cerca de metade das neoplasias malignas apresentam mutações nesse gene e consequentemente, na proteína p53 (Hollstein, 1994; Santos, 2009; Souza et al., 2011).

O câncer de cólon apresenta a frequência mais alta de alterações e, em relação aos cânceres geniturinários, o de próstata e bexiga são os que mais apresentam mutações (DeWolf, 1995; Yamaguchi et al., 1997; Lima et al., 2006; Santos, 2009). Uma vez ativada, a proteína do p53 poderá realizar as seguintes funções: regulação do ciclo celular (Gottliebe, 1996), apoptose (Lowe et al., 1993), senescência celular (Tyner et al., 2002), regulação da angiogênese (Bouck, 1996) e ainda interação com proteínas virais (Gottliebe e Oren, 1996), produtos de oncogenes (Maheswaean et al., 1995) e fatores de transcrição (Smith et al., 2003). E assim, evitar que linhagens de células cancerígenas se multipliquem.

Diante da importância da expressão de genes de reparo do DNA, o presente estudo também propôs analisar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53, relacionada ao presente estudo com CBNMI induzido quimicamente e seu comportamento após os tratamentos.

# 1.6 Tratamento Primário do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo – Bacillus Calmette-Guerin (BCG)

No início do século XX, foi desenvolvido uma estirpe (ou cepa) atenuada de *Micobacyerium bovis*, denominada *Bacilus Calmette-Guérin* (BCG) em homenagem a seus desenvolvedores, o médico e bacteriologista Charles Albert Calmette, e o veterinário e microbiologista Jean-Marie Camille Guérin, a qual revolucionou a imunoterapia, e passou a ser usada como arma poderosa contra a Tuberculose. Porém, os primeiros resultados sobre a aplicação da BCG na urologia, em especial no tratamento de câncer de bexiga urinária, foram publicados apenas em 1997, por Morales e colaboradores, no qual descrevia-se sua utilização intravesical (Morales et al., 1976).

Devido ao fácil acesso à bexiga urinária e, consequentemente, acessibilidade aos tumores que acometiam esse órgão, a administração local de um medicamento tornou-se muito atrativa. Porém, o sucesso da imunoterapia com BCG depende de alguns fatores como habilidade do organismo em desenvolver uma resposta imunológica aos antígenos da micobactéria, viabilidade adequada dos bacilos instilados, tamanho do tumor e contato direto com as células tumorais, em especial, à resistência dos indivíduos aos efeitos sistêmicos adversos causados pela sua aplicação (Kresowik e Griffith, 2009).

O câncer vesical, caracterizado por lesões superficiais (câncer de bexiga nãomúsculo invasivo - CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (Askeland et al., 2012). Os tumores superficiais são classificados em 3 estágios: Tis - carcinoma *in situ*; Ta - papilífero e T1 – tumor confinado a mucosa e submucosa da bexiga, ocorrendo em 10%, 70% e 20%, respectivamente (Ro et al., 1992; Epstein et al., 1998). O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da RTU, seguido da imunoterapia intravesical com BCG, para diminuição da recidiva e prevenção da progressão tumoral (Askeland et al., 2012). Contudo, 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 e colaboradores (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada atualmente a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior, inclusive, à quimioterapia intravesical, com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas e Brandau, 2003; Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução dos receptores do sistema imune, TLRs 2 e 4, com consequente indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical (Schamhart et al., 2000; Andreas e Brandau, 2003; Garcia et al., 2015; Garcia et al., 2016). Citocinas como TNF- $\alpha$ , fator estimulante de colônias de macrófagos (GMCSF), interferon (IFN) e interleucinas (ILs) induzem resposta de linfócitos T–*helper* e das células NK na bexiga (Andreas e Brandau, 2003; Garcia et al., 2015; Garcia et al., 2016).

De acordo com Schamhart e colaboradores (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 um 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, Pook e colaboradores (2002) demonstraram que células tumorais do CBNMI que internalizaram BCG apresentaram diminuição celular de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes mesmos autores verificaram que a combinação de BCG e o antioxidante N-acetilcisteína causou significante redução de EROs e aumento da citotoxidade nas células neoplásicas e sugeriram que os efeitos não-imunológicos do BCG podem determinar a resposta antitumoral. No entanto, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em predizer a resposta imune e antitumoral. O uso do BCG é limitado no CBNMI devido à falha do tratamento, efeitos adversos e intolerância que ocorrem em mais de dois terços dos pacientes (Perabo et al., 2005).

Complicações severas e óbito relacionados ao tratamento foram descritos (Berry et al., 1996). Efeitos secundários graves ocorrem em <5% de todos os pacientes submetidos à imunoterapia intravesical com BCG (Babjuk et al., 2008). Estima-se que aproximadamente 5-10% dos pacientes não conseguem completar o tratamento de indução com BCG, acarretando na interrupção do esquema terapêutico (Bohle et al. 2003; Ojea et al., 2007). A toxicidade da imunoterapia intravesical com BCG pode ser dividida em efeitos colaterais locais e sistêmicos. Os efeitos colaterais locais mais comuns incluem disúria (71%), hematúria (29%) e contratura vesical (3%) (Hall et al., 2007). Já os efeitos colaterais sistêmicos podem ser divididos em infecciosos (cistite bacteriana, epididimite, prostatite, infecções uretrais, sepse) e não-infecciosos (artralgias, reações cutâneas, anafilaxia), sendo que os sintomas de febres e calafrios ocorrem em 30% dos pacientes; epididimite, prostatite e infecções uretrais em 4%; sepse em 1%; e artralgias e reações cutâneas em 6% (O'Donnell e Bohle, 2006; Hall et al., 2007).

Apesar disso, até hoje, não há no mercado nenhuma outra terapia mais eficaz que o BCG. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas, são muito relevantes. Nesta linha, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do câncer, incluindo o CBNMI. Em face do papel estratégico dos imunoterápicos e dos avanços da nanotecnologia para produção de novas moléculas com atividade farmacológica, destacam-se os compostos que atuam como agonistas dos TLRs, os quais representam candidatos promissores contra o câncer.

## 1.7 Nova Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo: O Modulador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico I (MRB-CFI-1) - OncoTherad®

Embora o uso da RTU com quimioterapia ou imunoterapia adjuvantes represente um importante avanço no tratamento do CBNMI, o manejo deste tumor, principalmente para os de alto grau, continua sendo um desafio, devido às altas taxas de recorrência e progressão para os fenótipos músculo invasivo e/ ou metastáticos (Garcia et al., 2016).

Diferentes agentes quimioterápicos convencionais como: Gemcitabina, Mitomicina, combinação Gemcitabina e Mitomicina, Docetaxel e Valrrubicina têm sido utilizados na recorrência do CBNMI após uso da imunoterapia intravesical com BCG (Lightfott et al., 2011; Steinberg et al., 2011). A Valrrubicina, um análogo semissintético da Doxorrubicina, foi aprovada pelo órgão regulador norte-americano FDA (*Food and Drug Administration*) para uso em casos específicos de tumores pTis imunes ao BCG, sendo efetiva em menos de 10% dos pacientes (Steinberg et al., 2011). Além disso, protocolos baseados nas imunoterapias com interferon-alfa ou interferon-alfa associado ao BCG também têm sido utilizados (Lightfott et al., 2011).

Contudo, nenhum destes esquemas terapêuticos foram superiores ao uso isolado do BCG. A opção cirúrgica para tais casos, cistectomia parcial ou total, está frequentemente associada às altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, para alguns pacientes, a cistectomia não constitui uma opção disponível devido à presença de comorbidades concomitantes. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que previnam a progressão da doença, permitam a preservação do órgão e a qualidade de vida dos pacientes e, finalmente, que forneçam uma opção para aqueles que são inelegíveis à cistectomia.

Compostos que são capazes de agir como agonistas dos TLRs podem representar candidatos promissores a serem desenvolvidos como medicamentos contra o câncer. Nesse contexto, destaca-se o uso do agregado polimérico anidrídico fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA), o qual tem sido proposto com resultados promissores no tratamento do CBNMI (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2015; Dias et al., 2016; Garcia et al., 2016). O P-MAPA é um biopolimero não-linear, com massa molecular de 320 kDa, produzido por método biotecnológico utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* (Nunes e Durán, 2003). Os principais componentes da molécula são Mg<sup>2+</sup>, NH<sup>4+</sup>, fosfato, ácidos linoleico e palmitoleico e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da seguinte maneira: Asp 7,19%; Thr 3,56%; Ser 7,56%; Glu 8,53%; Pro 0,5%; Gly 9,69%; Ala 7,46%; Val 1,0%; Met 4,38%, Isoleu 2,54%, Leu 3,03%, Tyr 0,5%, Phe 1,0%, His 2,83%; Lys 3,56%, Trp 1,3% e Arg 35,2% (Nunes e Durán, 2003).

Experimentos *in vitro* com células HEK293 destacaram que o tratamento dessas células com P-MAPA ativou o NF- $\kappa$ B com consequente estimulação dos TLRs 2 e 4 (Fávaro et al., 2012). Garcia e colaboradores (2016) demonstraram que a imunoterapia intravesical com P-MAPA promoveu distinta ativação do sistema imune inato mediada por TLRs 2 e 4 em relação ao BCG, resultando no aumento da via de sinalização para interferons (TRIF, IRF3, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e aumento dos níveis proteicos de p53. Assim, esses mesmos autores concluíram que o P-MAPA atuou como agonista dos TLRs 2 e 4 e ativou p53, melhorando o estado imunológico no CBNMI.

Embora o P-MAPA constitua um importante composto para o tratamento do CBNMI, os seus processos de obtenção, purificação e caracterização são muito complexos e estão associados à um custo elevado. Os produtos derivados de fungos, como por exemplo o P-MAPA, são misturas complexas de numerosas entidades químicas. A caracterização completa de cada constituinte individual em medicamentos provenientes de fungos ou bactérias representa uma tarefa difícil. Assim, mesmo o P-MAPA apresentando um excelente resultado em CBNMI, sua caracterização química

ainda não está completamente definida, o que dificulta o controle de seus lotes de produção e a garantia de qualidade. A questão crucial para a aprovação de fármacos de origem fungica ou bacteriana é se os futuros lotes comercializados terão o mesmo efeito terapêutico que o observado em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como agonistas dos TLRs, o laboratório de Carcinogênes Urogenital e Imunoterapia (Instituto de Biologia – UNICAMP), liderado pelo professor Dr. Wagner José Fávaro, em parceria com o NANOBIOSS (Instituto de Química – UNICAMP), liderado pelo Prof. Nelson Duran, desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas muito similares ao P-MAPA, denominado MRB-CFI-1 (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1), que atualmente foi registrado como OncoTherad®.

O MRB-CFI-1 é um composto nanométrico de magnésio, amônio e fosfato de tamanho entre 420-530 nm que possui patente depositada na fase incial nacional do PCT (Número: BR 1020170127680) pela agência de inovação INOVA – UNICAMP. Foram utilizadas várias proporções dos diferentes componentes do P-MAPA até chegar à uma estrutura semelhante na ausência total de proteínas e lipídeos, e com partículas em escala nanométrica (**Figura 3** – Análise por difração de raios X – XRD). Após um estudo exaustivo, foi obtida a melhor proporção para obtenção do fosfato cristalizado (sintético), o qual foi denominado de Complexo Fosfato Inorgânico 1 (CFI-1). Na **Figura 3** são observadas algumas diferenças nas fases cristalinas do P-MAPA [regiões (002) e (011)] e CFI-1 [(021) e (004)] (Dados não publicados – Fávaro et al.).



Figura 3: Análise de XRD: Comparação entre P-MAPA e CFI-1.

Fonte: Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia.

Nas análises de termogravimetria (TGA) são encontradas outras diferenças entre o PMAPA e o CFI-1 (**Figura 4**). Nesta análise a perda de água e grupos aminos foram rapidamente observados ao redor dos 100°C (40% de perda de massa) no P-MAPA. Entretanto, no CFI-1 a perda de água foi menor, considerando a mesma temperatura de 100°C, uma vez que esse complexo inorgânico não possui grupos aminos (10% de perda de massa) (**Figura 4**). E as análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) demonstraram que o ponto de fusão do CFI-1 foi maior que o do P-MAPA (**Figura 5**).



Figura 4: Análise de TGA: Comparação entre P-MAPA e CFI-1.

Fonte: Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia.



Figura 5: Análise de DSC: Comparação entre P-MAPA e CFI-1.

Fonte: Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia.

Após a caracterização da parte inorgânica do composto MRB-CFI-1, foi desenvolvida e caracterizada a parte proteica. A parte proteica do MRB-CFI-1 foi desenvolvida em função da parte proteica do P-MAPA. A proteína presente no P-MAPA (0,5%) possui peso molecular de 10-12 kDa, sendo constituída por Arginina (35,2%), Serina (7,6%), Treonina (3,6%) e Tirosina (0,5%). A partir dessa composição, buscou-se uma proteína extraída de fonte natural animal que tivesse uma distribuição de aminoácidos semelhante à do P-MAPA. Após vários experimentos, foi encontrada uma proteína que apresentou alto grau de complexação com o CFI-1, com peso molecular entre 14-16 kDa e com a seguinte distribuição de aminoácidos: Arginina (9%), Serina (8%), Treonina (7%) e Tirosina (2%), sendo denominada de P14-16. Embora não seja a mesma proteína presente no P-MAPA, a proteína do MRB-CFI-1 é muito similar.

A síntese detalhada do MRB-CFI-1 não pode ser descrita, pois está sob sigilo de patente pela INOVA-UNICAMP. Uma possível hipótese do mecanismo de ação tanto do P-MAPA como do MRB-CFI-1 em desencadear a estimulação do sistema imune é a fosforilação de aminoácidos hidroxilados como serina, treonina e tirosina por compostos que apresentam sais de fosfato. As análises dos cristais da proteína P14-16 por densidade eletrônica de Fourier demonstraram que o íon magnésio pode se complexar facilmente entre os aminoácidos Asp52, GIn57 e Glu35, demonstrando um potencial enorme de complexação entre os fosfatos e o magnésio do MRB-CFI-1.

Ainda, uma outra hipótese do mecanismo de ação do composto MRB-CFI-1 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 e colaboradores (2012) demonstraram que a administração intratumoral de oligonucleotídeos CpG reduzem a atividade imunossupressora de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC). Além disso, verificaram que as MDSC monocíticas do microambiente tumoral expressaram TLR e responderam à estimulação de oligonucleotídeos CpG por intermédio da perda de sua capacidade de suprimir a função das células T, pela produção de citocinas Th1 e de sua diferenciação em macrófagos com capacidade tumoricida, contribuindo para a regressão tumoral. Similarmente, Corrales e colaboradores (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.

A fim de caracterizar a estrutura química e os mecanismos antitumorais e imunomodulatórios do composto MRB-CFI-1, o presente trabalho foi desenvolvido, objetivando posicionar esse composto como uma possível alternativa terapêutica para o CBNMI.

#### 1.8 Justificativa

Considerando que o tratamento com BCG apresenta diversos efeitos colaterais e falha em grande parte dos casos; associada à necessidade de desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como agonistas dos TLRs, e que principalmente, reduzam as taxas de recorrência, progressão tumoral, e tenham impactos positivos na evolução clínica dos pacientes com CBNMI; o nosso laboratório – Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (LCURGIM), liderado pelo professor Dr. Wagner José Fávaro, em parceria com o NANOBIOSS (Instituto de Química – UNICAMP), liderado pelo Prof. Dr. Nelson Durán, desenvolveu um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas muito similares ao P-MAPA, denominado MRB-CFI-1 (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico-1), o qual foi registrado como OncoTherad®.

Os estudos iniciais do nosso grupo demonstraram que no tratamento *in vivo* do CBNMI com o MRB-CFI-1 houve regressão significativa do tumor, indicando um importante efeito antitumoral deste composto envolvendo a via sinalização para interferon mediada por TLR4. Assim, a contribuição do presente estudo para o desenvolvimento do OncoTherad® (MRB-CFI), além de caracterizá-lo quimicamente, é identificar os possíveis mecanismos de ação e seus efeitos biológicos no tratamento do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo em camundongos.

# 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar os possíveis mecanismos de ação e os efeitos biológicos do MRB-CFI-1 (OncoTherad®), bem como de seus componentes (CFI-1 e P14-16) no tratamento do câncer de bexiga urinária não-músculo invaivo induzido quimicamente, comparados ao tratamento com BCG, considerado o padrão ouro para tratamento de câncer de bexiga.

### 2.2 Objetivos Específicos

O objetivo geral do estudo será alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a histopatologia do CBNMI de camundongos C57BL/6J induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente ao composto MRB-CFI-1 e seus constituintes (CFI-1 e proteína P14-16);
- Caracterizar e comparar os efeitos do composto MRB-CFI-1 e seus constituintes (CFI-1 e proteína P14-16) nas vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 (TLR2, TLR4, IKK-α, MyD88, NF-κB, IL-6, TNF-α, TRIF, IRF3, IFN-γ) e p53;
- Caracterizar e comparar os efeitos do composto MRB-CFI-1 e seus constituintes (CFI-1 e proteína P14-16) no sistema RANK/ RANKL e os marcadores de Linfócitos Treg PD-L1 e FOXP3, por imunomarcação no CBNMI de camundongos induzidos quimicamente;
- Quantificar por western blotting a expressão de PD1/PDL.

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 Grupos experimentais: Indução do CBNMI e Tratamento

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, de acordo com as Diretrizes da *American Psychological Association* para Conduta Ética no Cuidado e Uso de Animais. Os protocolos do estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas, o protocolo seguiu rigorosamente os princípios éticos em pesquisa animal (CEUA / IB / UNICAMP - protocolo número: 4579-1 / 2017).

No Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), foram obtidos 60 camundongos C57BI / 6J fêmeas, com 7 semanas de idade, pesando em média 30 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp, alojados em gaiolas de polietileno com enriquecimento ambiental (**Figura 6**) com a finalidade manter o bem-estar dos animais, em um ciclo de claro/escuro (12h/12h), a uma temperatura de 22ºC e com livre acesso a ração e água filtrada.



Figura 6: Camundongos C57Bl/ 6J em caixas de polietileno demonstrando o enriquecimento ambiental.

Fonte: arquivo pessoal.

Após o período de adaptação, dez animais foram destinados ao Grupo Controle, para comparação da bexiga saudável. Nos demais animais o câncer de bexiga foi induzido quimicamente, esses animais receberam 0,10 ml de N-Nitroso-N-Etilureia (Sigma-Aldrich), dissolvido em DMSO 30% (Sigma-Aldrich); que corresponde a 50 mg/ml de N-etil-N-nitrosoureia, por via intravesical a cada duas semanas por 6 semanas (Dias et al., 2016; Garcia et al., 2016). Duas semanas após as induções de CBNMI, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 5 grupos: Câncer (n = 10), Câncer + BCG (n = 10), Câncer + OncoTherad® MRB-CFI-1 (n = 10), Câncer-P14-16 (n = 10) e Câncer-CFI-1 (n = 10).

Os animais do grupo Câncer e do grupo Controle, foram eutanaziados uma semana após a última indução do CBNMI (**Figura 7**), pois o estudo pretendeu avaliar se os tratamentos foram capazes de impedir a progressão tumoral, e para isso foi necessário o estadiamento do CBNMI nos animais do grupo Câncer. Já o grupo Controle, justifica-se pela necessidade de comparação das bexigas dos grupos tratados com uma bexiga saudável.

Uma semana após a última indução dos CBNMI, os demais grupos começaram a receber o tratamento num esquema semanal (uma vez por semana) durante seis semanas, por via intravesical por meio de um angiocateter de calibre de 24 gauge. O grupo Câncer + BCG recebeu a dose de 10<sup>6</sup> CFU (40 mg) de BCG. O grupo Cancer + Oncotherad® (MRB-CFI-1) recebeu 0,10 ml de OncoTherad® (MRB-CFI-1) (dose de 20 mg/ml). O grupo Câncer + P14-16 recebeu 0,10 ml de proteína (dose de 20 mg/ml) e o grupo Câncer + CFI-1 recebeu 0,10 ml de CFI-1 (dose de 20 mg/mL). O volume aplicado na bexiga foi de 0,1 ml. O delineamento experimental pode ser observado na **Figura 7**.

Antes de cada cateterismo intravesical, os animais foram anestesiados com cetamina 10% (60 mg / kg, i.p. (intraperitoneal); Ceva Animal Health Ltda, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (5 mg / kg, ip; Ceva Animal Health Ltda, São Paulo, Brasil). Os animais permaneceram anestesiados por aproximadamente 45 minutos após o cateterismo para evitar a micção espontânea.



Figura 7: Delineamento experimental.

#### Fonte: arquivo pessoal.

Os animais foram eutanaziados uma semana após a última dose do tratamento, com injeção i.m. (intramuscular) de xilazina e cetamina (5 mg/kg e 80 mg/kg, respectivamente). Uma laparotomia mediana foi realizada para expor os órgãos, os rins e os ureteres foram observados para detectar alterações macroscópicas. As bexigas urinárias de 6 animais de cada grupo foram coletadas e processadas para análise histopatológicas e imuno-histoquímica, as demais bexigas (n=4) de cada grupo foram congeladas em nitrogênio líquido para análises de *Western Blotting*.

#### 3.2 Análises Histopatológicas

As amostras de bexigas urinárias coletadas de cada grupo (n = 6), foram fixadas em solução de Bouin (ácido pícrico saturado, formaldeído 10% e ácido acético glacial). Após 24 horas da fixação, e de acordo com Garcia et al. (2016), as amostras foram lavadas em etanol (70%) e desidratadas em uma série crescente de etanol (80%, 90% e 100%). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e incluídos em polímero plástico (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em

seguida, as amostras foram cortadas em micrótomo rotativo Slee CUT5062 RM 2165 (Slee Mainz, Mainz, Alemanha), com 5 µm de espessura, coradas com hematoxilinaeosina e fotografadas com fotomicroscópio Leica DM2500 (Leica, Munique, Alemanha). Um uropatologista sênior analisou as lesões da bexiga urinária de acordo com a Organização Mundial da Saúde da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epistein et al., 1998).

#### 3.3 Análises Imuno-histoquímicas

As mesmas amostras usadas para o estudo histopatológico foram utilizadas para as imunomarcações. As amostras foram cortadas em seções de 5 µm de espessura e a recuperação do antígeno foi realizada por protocolo padrão. Para o bloqueio da peroxidase endógena em solução de bloqueio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as secções foram incubadas a temperatura ambiente, seguindo protocolos padrão.

# 3.3.1 Via de sinalização dos Receptores Toll-Like (TLR2, TLR4, MyD88, IRF-3, IKK-α, NF-kB, TNF-α, TRIF, IFN-γ, IL-6)

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-TLR2 policional de coelho (BS1019R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1: 100), anti-TLR4 monocional de camundongo (SC293072, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1:75), anti-MyD88 policional de coelho (SC11356, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1:50), anti-IRF-3 monocional de camundongo (SC376455, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1:50), anti-IKK-α policional de coelho (SC7218, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1:50), anti-IKK-α policional de coelho (SC7218, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1: 100), anti-NFκB policional de coelho (ab7970; Abcam, EUA, 1: 300), anti-TNF-α policional de coelho (SC67061, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1: 150), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IFN-γ policional de coelho (BS0480R, Bioss, Massachusetts, EUA; 1:50), anti-IL- policional de cabra 6 (SC1265, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; 1:75). Os anticorpos foram diluídos em 1% de BSA e aplicados às seções *overnight* a 4 °C (Garcia et al., 2016).

Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo

secundário HRP conjugado do kit Super Sensitive Polymer HRP IHC (BioGenex, Netherlads) por 40 minutos. Posteriormente, os cortes foram marcados com diaminobenzidina (DAB), e corado com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram avaliados no fotomicroscópio Leica DM2500 (Leica, Munich, Germany) equipado com câmera DFC295 (Leica, Munich, Germany).

#### 3.3.2 RANK/ RANKL, FOXP3, PD-1/PD-L1 e p53

Durante a realização das análises imuno-histoquímicas, o kit Super Sensitive Polymer HRP IHC foi descontinuado, portanto, foi necessária a aquisição de um novo Kit, e mudanças de protocolo até então utilizado. Para essas análises, as mesmas amostras de bexigas urinárias processadas para histopatologia e imunohistoquímica, foram cortadas em um micrótomo rotativo Slee CUT5062 RM 2165 (Slee Mainz, Mainz, Alemanha), com 5 µm de espessura, e a recuperação do antígeno foi realizada por protocolo padrão. Em seguida, as seções foram incubadas em 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para bloquear a peroxidase endógena e a ligação não específica foi bloqueada pela incubação das seções em solução de bloqueio EasyLink One (EP-12-20504, EasyPath) em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anti-RANK monoclonal de camundongo (SC374360, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, 1:50); anti-RANKL monoclonal de camundongo (SC52950, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, 1:50); anti-PD-1/PD-L1 monoclonal de coelho (SC51802L, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, 1:50); anti-FOXP3 monoclonal de coelho (BS-0269R, Bioss, Massachusetts, USA, 1:200); antip53 monoclonal de camundongo (GTX7021, GeneTex, Califórnia, EUA, 1:500).

Os anticorpos foram diluídos em soro de cabra a 1% e aplicados aos cortes overnight a 4°C. Os anticorpos ligados foram detectados com um kit Polymer HRP IHC EasyLink One (EP-12-20504, EasyPath) de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente, os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) e corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram avaliados no fotomicroscópio Leica DM2500 (Leica, Munich, Germany) equipado com câmera DFC295 (Leica, Munich, Germany).

#### 3.3.3 Análise da Intensidade de Imunorreatividade

A intensidade da imunorreatividade do antígeno foi examinada usando fotomicroscópio Leica DM2500 (Leica, Munique, Alemanha) equipado com uma câmera DFC295 (Leica, Munique, Alemanha), e cinco campos para cada animal, por anticorpo, foram capturados usando aumento de 400x. A porcentagem de células uroteliais positivas para a bexiga urinária para cada anticorpo foi calculada usando o IHC *profile* (software ImageJ 6.0). A intensidade foi categorizada em uma escala de 0-3 e classificada como 0 (ausência de imunorreatividade): 0% células uroteliais positivas; 1 (imunorreatividade fraca): 1-35% de células uroteliais positivas; 2 (imunorreatividade moderada): 36-70% de células uroteliais positivas; 3 (imunorreatividade intensa): > 70% de células uroteliais positivas (Garcia et al., 2015; Stopglia et al., 2015).

### 3.4 Proporção de Núcleos p53 positivos e Cálculo da Intensidade da imunorreatividade

Os núcleos p53 positivos foram contados em aumento de 100x e porcentagem de células positivas foi determinada dividindo-se o número de células positivas pelo número total de células encontradas nos campos microscópicos.

Para avaliar a intensidade das imunorreações dos antígenos nas células uroteliais da bexiga urinária foram selecionados cinco campos com aumento de 100x (com óleo de imersão) para cada animal e cada anticorpo. Os resultados das imunomarcações foram analisados utilizando o software Image J (https://imagej.nih.gov/ij/) em Análise de Perfil Macro a partir da seleção do urotélio e quantificação das células uroteliais positivas (adaptado de Dias et al., 2018).

Os dados quantitativos foram avaliados de duas maneiras: Imunorreatividade Total e Intensidade da Imunorreatividade. A imunorreatividade total foi obtida como o resultado da porcentagem de células uroteliais negativas para determinado anticorpo subtraídas de 100%, ou seja, os valores representam o total de células uroteliais no campo que apresentaram imunorreação para o anticorpo avaliado. A análise da Intensidade da Imunorreatividade foi realizada a partir da categorização da imunorreação ocorrente nas células uroteliais por critério de intensidade. As categorias definidas no software Image J foram: ausente (*Negative*), fraca (*Low Positive*), moderada (*Positive*) e forte (*High Positive*). Os valores obtidos nas diferentes categorias de intensidade foram representados em gráficos de colunas e equivalem a porcentagem de células uroteliais no campo que apresentou marcação em cada nível (ausente, fraca, moderada ou forte) para determinado anticorpo

#### 3.5 Western Blotting: PD-1/PD-L1

Amostras da bexiga urinária de 4 animais de cada grupo experimental foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, submetidas às análises de *Western Blotting*. A bexiga urinária foi homogeneizada em RIPA Lysis Buffer (Merck Millipore, Massachusetts, EUA), contendo Triton-x-1% e inibidor de protease cocktail 10 µl / ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os extratos da bexiga urinária foram obtidos por centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C.

A determinação da concentração de proteína foi realizada pelo método de Bradford e analisada por ELISA (Multiskan FC Photometer, Standard; Thermo Fisher Scientific, EUA). Os 50 microgramas correspondentes de proteína foram aplicados ao gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com RAPID Block Solution (GE Healthcare Life Science, Estados Unidos) diluída em TBS-T por dez minutos e incubadas *overnight* com anticorpo primário (mouse monoclonal anti-PD-1 / PD-L1 SC51802L; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA; diluição: 1: 1.200). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG A2304, 1:10.000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA; anti-rabbit IgG AP132P, 1:5.000, Millipore, Massachusetts, EUA) diluídos em BSA a 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade da peroxidase foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O anticorpo mouse monoclonal anti-β-actina (SC47778, 1: 750; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) foi usado como um controle endógeno.

A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria usando o programa de análise de imagem NIH ImageJ 6.0 (National Institute of Health, EUA. Disponível em: http://rsb.info.nih.gov/ij/) (Garcia et al., 2016).

### 3.6 Análises Estatísticas

O Teste de Proporções (Teste do Qui-quadrado) foi aplicado para análises histopatológicas com dados qualitativos. Para as análises Imuno-histoquímicas e de *Western Blotting*, foi calculada a média de imunorreatividade ou intensidade de cada grupo e os dados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey quando apresentassem normalidade. Na ausência de normalidade, foi realizado o teste de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. As imunorreatividades por categoria de intensidade de marcação foram representadas em gráficos de colunas e os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA Two Way), complementada pelo teste de Tukey para cada nível de imunorreação (ausente, fraco, moderado ou forte). Os softwares GraphPad Prism, versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e BioEstat 5.0 (Mamirauá Civil Society / CNPq, Belém, PA, Brasil) foram utilizados para realizar as análises e confecção dos gráficos. A significância estatística estabelecida foi de 5% (p <0,05) para todos os testes aplicados.

## 4. RESULTADOS

# 4.1 Tratamento com OncoTherad® recuperou os aspectos macroscópicos das bexigas urinárias

Durante a eutanásia dos animais, foi realizada a observação macroscópica da estrutura e integridade dos órgãos do aparelho urinário (bexiga, rins e ureteres). Os resultados são apresentados na **Tabela 2** e as bexigas representativas de cada grupo podem ser observadas na **Figura 8**.

As bexigas dos animais do grupo Controle não demonstraram alterações estruturais aparentes, como esperado, as paredes das bexigas apresentam-se finas, translúcidas e com vascularização normal, sem presença de lesões (**Figura 8-A**). Os rins demonstraram consistência compacta e dura, de cor avermelhada, sem nenhuma alteração macroscópica, assim como os ureteres (**Tabela 2**).

Em contrapartida, os animais do grupo Câncer apresentaram diversas alterações no trato urinário, como espessamento em todas as bexigas (70% leve e 30% intenso), bem como aumento da vascularização em 50% dos casos, a presença de lesões vegetantes foi observada em 80% das bexigas (**Tabela 2, Figura 8-B**). A maioria dos animais do grupo Câncer apresentarem hidroureter uni ou bilateral, foi observado nesse grupo lesão renal em um dos animais, caracterizada pela presença de um nódulo esbranquiçado (**Tabela 2**).

Alguns animais tratados com OncoTherad® apresentaram leve espessamento da bexiga (60% dos casos) e apenas um animal apresentou lesão aparente (10%), a vascularização da bexiga foi considerada normal na maioria dos casos, porém, 30% das bexigas analisadas apresentaram a vascularização um pouco aumentada, contudo alguns animais exibiram bexigas urinárias com aspecto macroscópico normal igual às do grupo Controle (**Tabela 2, Figura 8-C**). Discreto hidroureter uni ou bilateral também foi observado nesse grupo, e nenhum animal apresentou lesões aparentes nos rins, os quais demonstraram aspecto macroscópico normal.

Os animais tratados com P14-16 também não apresentaram lesões macroscópicas nos rins, porém a presença de hidroureter bilateral predominou nesse

grupo. As bexigas urinárias apresentaram espessamento leve em 50% dos animais desse grupo, e 20% apresentaram lesões vegetantes, porém a vascularização de 80% das bexigas exibiu aspecto normal (**Tabela 2, Figura 8-D**).

No grupo Câncer + CFI-1 a maioria das bexigas apresentaram-se espessadas (50% leve e 30% intensa), porém em sua maioria com vascularização normal (70%) (**Figura 8-E**) e apenas 10% com lesão vegetante aparente. Hidroureter unilateral foi observado na maioria dos animais desse grupo, porém, nenhum rim apresentou lesões aparentes (**Tabela 2**).

Curiosamente, no grupo tratado com BCG a maioria das bexigas apresentaram intenso espessamento, e acentuada vascularização, porém sem *nenhuma lesão aparent*e (**Figura 8-F**). Hidroureter bilateral foi observado em 80% dos animais desse grupo, e nenhuma lesão renal aparente foi observada (**Tabela 2**).

	Grupos experimentais (n=10 animais/grupo)						
Aspectos Macroscópicos	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad® MRB-CFI-1	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG	
Espessamento da bexiga:							
Ausente	10/10	0	3/10	2/10	2/10	1/10	
Leve	0	7/10	6/10	5/10	3/10	2/10	
Intenso	0	3/10	1/10	3/10	5/10	7/10	
Lesão aparente na bexiga:							
Ausente	10/10	2/10	9/10	8/10	9/10	10/10	
Presente	0	8/10	1/10	2/10	1/10	0	
Vascularização da bexiga:							
Normal	10/10	5/10	7/10	8/10	7/10	2/10	
Acentuada	0	5/10	3/10	2/10	3/10	8/10	
Ureteres:							
Normais	10/10	3/10	4/10	2/10	3/10	2/10	
Hidroureter unilateral	0	3/10	3/10	3/10	6/10	2/10	
Hidroureter bilateral	0	4/10	3/10	5/10	1/10	8/10	
Rins							
Sem lesão	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	
Com lesão	0	1/10	0	0	0	0	

 Tabela 2: Aspectos macroscópicos das bexigas urinárias e a incidência nos diferentes grupos experimentais.

Incidência = número de animais que apresentaram determinada característica/ número total de animais do grupo experimental.



Figura 8: Fotografias das Bexigas Urinárias representativas dos diferentes grupos experimentais.

Imagens representativas dos grupos experimentais: (A): Controle, exibindo bexiga saudável, com parede fina, semi-translúcida e vascularização normal; (B): Câncer: destacando vários pontos de espessamento ( $\rightarrow$ ) e vascularização normal; (C): Câncer+OncoTherad® - MRB-CFI-1, mostrando uma bexiga levemente espessada e e de vascularização normal; (D): Câncer+P14-16: bexiga espessada ( $\rightarrow$ ), altamente vascularizada (seta larga) e destacando a presença de lesões (círculos); (E): Câncer+CFI-1, bexiga com discretos pontos de espessamento ( $\rightarrow$ ) e vascularização aumentada em alguns pontos (seta larga); (F) Câncer+BCG: bexiga altamente espessada ( $\rightarrow$ ) com discreta vascularização (seta larga). As fotografias foram capturadas com Lupa (Leica - Munich, German). Aumento de 3,5X.

# 4.2 O tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) inibiu a progressão tumoral em camundongos com CBNMI induzido quimicamente

O trato urinário dos camundongos do grupo Controle não apresentou alterações

histológicas. O urotélio normal consistia em duas ou três camadas de células: camada de células basais, apoiadas na membrana basal; camada de células intermediárias e uma camada superficial ou apical, que consiste em células guarda-chuva (**Figura 9-A, Tabela 3**). O trato urinário do grupo câncer apresentou severas alterações histopatológicas, como carcinoma urotelial invasivo (pT1) e carcinoma *in situ* (pTis) em 16,7% e 83,3% dos animais, respectivamente (**Figura 9-D e 9-F; Tabela 3**). Pequenos grupos de células neoplásicas ou cordões de células que invadem a mucosa conjuntiva, figuras mitóticas frequentes e células pleomórficas com núcleos estendidos e diferenciação escamosa focal ilustram o carcinoma pT1 (**Figura 9-F**). O carcinoma pTis foi caracterizado pela proliferação de células uroteliais em um urotélio plano, células com atipia, como núcleos gigantes, redução do citoplasma e múltiplos e protuberantes nucléolos (**Figura 9-D**).

Ao contrário, o grupo tratado com OncoTherad® (MRB-CFI-1) apresentou 100% de regressão tumoral, o que é um ótimo prognóstico. Bexiga e trato urinário normal foram visualizados em 50% dos animais, hiperplasia plana em 16,7% e neoplasia intraurotelial de baixo grau em 33,3%, que não se caracterizam como lesões malignas (**Figura 9, Tabela 3**). A hiperplasia plana foi caracterizada pelo espessamento do urotélio e pela inexistência de atipias citológicas (**Figura 9B**). A presença mínima de atipia, com aumento da proliferação celular e espessamento do urotélio (**Figura 9C**), caracterizou a neoplasia intraurotelial de baixo grau.

Os animais tratados com P14-16 apresentaram 50% de regressão tumoral, assim como CFI-1 (**Tabela 3**). O tratamento com BCG apresentou regressão de 66,7% conforme mostram os dados na **Tabela 3**. O carcinoma urotelial papilar (pTa) foi identificado em 16,7% dos animais tratados com P14-16 e pode ser descrito por lesões papilares ou não papilares, um arranjo desordenado de células uroteliais e perda de polaridade, núcleos pleomórficos e hipercromáticos e nucléolos protuberantes, conforme mostrado na **Figura 9-E**, na qual está representada uma lesão papilífera invertida, muito comum em camundongos.



Figura 9: Histopatologia representativa das bexigas urinárias de camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Figuras mostram as secções histológicas das bexigas urinárias dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina. (A): Grupo Controle: urotélio normal composto de 2-3 camadas, ( $\leftarrow$ ) vaso sanguíneo, tecido conjuntivo. (B): Grupo Câncer + BCG: Hiperplasia plana, evidenciando espessamento do urotélio e ausência de atipia citológica. (C) Grupo Câncer + OncoTherad®: Neoplasia Intraurotelial de Baixo Grau, caracterizada pela presença mínima de atipia celular. (D) Grupo Câncer + CFI-1: Neoplasia Intraurotelial de Alto Grau - Carcinoma *in situ* (pTis), mostrando proliferação desordenada de células uroteliais em um urotélio plano. (E) Grupo Câncer + P14-16: Carcinoma Papilar Urotelial (pTa), apresentando lesões papilares, desordem de células uroteliais e perda de polaridade, núcleos hipercromáticos e pleomórficos. (F) Grupo Câncer: Carcinoma Urotelial Invasivo (pT1), apontando pequenos grupos ou cordões invadindo a mucosa conjuntiva e ( $\leftarrow$ ) células pleomórficas com núcleos aumentados e diferenciação escamosa focal. (Ur): urotélio. (CT): tecido conjuntivo. (M): tecido muscular. Barra de escala = 50 µm.

**Tabela 3:** Porcentagem das alterações histológicas nas bexigas urinárias dos diferentes grupos experimentais e Inibição da Progressão Tumoral (%).

	Grupos Experimentais (n=6)					
Histopatologia	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad ® (MRB-CFI-1)	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG
Normal	6 (100%)*	-	3 (50,0%) *	1 (16,7%) #	3 (50,0%) #	-
Hiperplasia Plana	-	-	1 (16,7%) *	1 (16,7%) #	-	4 (66,7%) *
Neoplasia Intraurotelial de Baixo Brau	-	-	2 (33,3%) *	1 (16,7%) #	-	-
Neoplasia Intraurotelial de Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	5 (83,3%)	-	1 (16,7%)	3 (50,0%)	2 (33,3%)
Carcinoma Urotelial Papilífero (pTa)	-	-	-	1 (16,7%)	-	-
Carcinoma Urotelial Invasivo (pT1)	-	1 (16,7%)	-	1 (16,7%)	-	-
Inibição da Progressão Tumoral	-	0% <sup>a</sup>	100% <sup>b</sup>	50% <sup>c</sup>	50% <sup>c</sup>	66,7% <sup>bc</sup>

Taxa de inibição (%) obtida nos diferentes tratamentos.

\* Significância estatística em comparação ao Grupo Câncer (p <0,05). # Significância estatística dos grupos Câncer e Câncer + OncoTherad® (p <0,05). Inibição da progressão do tumor: Porcentagem de animais que não apresentavam lesões malignas em comparação com o grupo Câncer. Na mesma linha, valores seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p <0,05). Teste Qui-quadrado (Teste Z de Proporção). Lesões benignas: hiperplasia plana. Lesões Pré-Malignas: Neoplasia Intraurotelial de Baixo Grau. Lesões malignas: pTis, pTa e pT1.

# 4.3 OncoTherad® promoveu distinta ativação da via de receptores *Toll-Like* através do aumento da imunorreatividade da via-canônica e não-canônica

Embora não tenha havido diferença estatística (p>0,05), em números absolutos, os maiores níveis de proteína TLR2 foram detectados nos grupos OncoTherad® (MRB-CFI-1), P14-16 e BCG, apresentando padrão de expressão de TLR2 semelhante ao grupo Controle. Em contraste, em animais com CBNMI induzido quimicamente, a imunorreatividade de TLR2 foi menor após o tratamento com CFI-1 comparado ao tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1). Os dados estão representados na **Tabela 4** e podem ser confirmados na **Figura 10-A**.

A imunorreatividade do MyD88 foi classificada como moderada no grupo Câncer + CFI-1 e Câncer + BCG em comparação ao grupo Controle, que apresentou intensa imunorreatividade para essa proteína. Dessa forma, foi possível observar que os animais tratados com BCG e CFI-1 apresentaram redução significativa da expressão dessa proteína em relação ao grupo Controle (p<0,05) (**Tabela 4, Figura 10-B**). Por outro lado, os animais tratados com OncoTherad® (MRB-CFI-1) e P14-16 apresentaram níveis dessa proteína iguais (p>0,05) ao grupo Controle.

Em animais com câncer tratados com BCG, o tratamento promoveu uma regulação positiva (*up-regulation*) nos níveis da proteína IKK-α em comparação com o tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) ou CFI-1 (**Tabela 4, Figura 10-C**). Porém, comparando o tratamento P14-16 com OncoTherad® (MRB-CFI-1), a imunorreatividade desse receptor foi maior no grupo que foi tratado apenas com o composto proteico (P14-16).

O grupo tratado com P14-16 apresentou intensa imunorreatividade para NFκB no citoplasma das células uroteliais, em comparação aos demais grupos, que exibiram níveis moderados de proteína (**Tabela 4** e **Figura 10-D**). O tratamento com P14-16 promoveu uma regulação positiva de NFκB em comparação com o tratamento com CFI-1 ou BCG (p<0,05). Em contraste, o tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) aumentou a expressão de NFkB quando comparado aos grupos Controle e Câncer, assim como os animais tratados com CFI-1 (p<0,05).

Todos os grupos apresentaram imunorreatividade moderada para IL-6 (**Tabela 4, Figura 10-E**). No entanto, os tratamentos P14-16 e BCG promoveram maior

64

expressão de IL-6 (p<0,05). No entanto, não houve diferenças significativas após o tratamento com CFI-1 em comparação ao OncoTherad® (MRB-CFI-1).

Os níveis da proteína TNF- $\alpha$  foram expressivamente maiores nos grupos Câncer, Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1) e Câncer + BCG em relação a todos os outros grupos experimentais, apresentando intensa imunorreatividade do urotélio. No entanto, esses níveis foram moderados nos grupos Controle, Câncer, Câncer + P14-16 e grupo Câncer + CFI-1 (**Tabela 4**, **Figura 10-F**). Por outro lado, em animais com CBNMI, os tratamentos com BCG e com OncoTherad® (MRB-CFI-1) aumentaram os níveis da proteína TNF- $\alpha$ , em comparação ao grupo Controle e ao grupo Câncer + CFI-1 (p<0,01).

Embora não tenha havido diferença estatística (p>0,05), em números absolutos os níveis da proteína TLR4 foram maiores nos grupos Controle e Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1) em relação aos demais grupos, que apresentaram padrões moderados de imunorreatividade. Os grupos Controle e Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1) apresentaram intensa imunorreatividade no urotélio (**Tabela 4, Figura 11-A**). Porém, após o tratamento com CFI-1, a expressão de TLR4 diminuiu em relação ao grupo Controle. Portanto, todos os outros tratamentos apresentaram padrões de expressão de TLR4 semelhantes (p>0,05) em comparação com animais saudáveis (grupo Controle).

Um nível mais alto de proteína TRIF foi encontrado nos grupos Controle e Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1). Esses grupos apresentaram intensa imunorreatividade dessa proteína, em relação aos demais grupos, que apresentaram moderada imunorreatividade (**Figura 11-B**). Camundongos tratados com CFI-1 e Oncotherad® mostraram elevada imunorreatividade de TRIF (p<0,05) em comparação aos camundongos tratados com BCG (**Tabela 4**).

Os níveis mais elevados de proteína IRF-3 foram exibidos no grupo Câncer + BCG, em comparação a todos os outros grupos, que apresentaram imunorreatividade moderada dessa proteína no urotélio. Oncotherad® (MRB-CFI-1), BCG e P14-16 promoveram aumento da imunorreatividade de IRF3 em relação ao Grupo Controle (p<0,01). Os dados estão tabelados (**Tabela 4**) e podem ser confirmados na **Figura 11-C**. Comparando os níveis de IFN- $\gamma$ , os grupos apresentaram imunorreatividade moderada ao urotélio, exceto os grupos Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1) e Câncer + P14-16, que mostraram intensa imunorreatividade do urotélio para essa proteína (**Tabela 4, Figura 11-D**) em comparação com o grupo Controle (p <0,01). No entanto, P14-16 promoveu maior expressão de IFN- $\gamma$  em relação ao tratamento com CFI-1 (p<0,01), assim como em relação aos animais do grupo Câncer (p <0,05) e animais saudáveis (Grupo Controle, p<0,01). O tratamento com OncoTherad® (MRB-CFI-1) não apresentou diferenças significativas em comparação ao tratamento com P14-16. **Tabela 4:** Médias da intensidade de imunorreatividade para os diferentes antígenos na bexiga urinária de camundongo C57BL / 6J dos diferentes grupos de tratamento.

Grupos (n=6)						
Antígenos	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad® MRB-CFI-1	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG
TLR-2	3 (75,8%) <sup>a</sup>	2 (66,3%) <sup>a</sup>	3 (76,5%) <sup>a</sup>	3 (71,4%) <sup>a</sup>	2 (62,5%) <sup>a</sup>	3 (71,7%) <sup>a</sup>
MyD88	3 (73,9%) <sup>a</sup>	2 (66,4%) <sup>ab</sup>	2 (60,6%) <sup>ab</sup>	3 (71,4%) <sup>ac</sup>	2 (55,2%) <sup>b</sup>	2 (56,7%) <sup>bc</sup>
ΙΚΚ-α	3 (75,4%) <sup>a</sup>	2 (68,8%) <sup>ab</sup>	2 (55,5%) <sup>b</sup>	3 (76,5%) <sup>a</sup>	2 (60,9%) <sup>bc</sup>	3 (73,8%) <sup>ac</sup>
NFκ-B	2 (49,1%) <sup>a</sup>	2 (63,0%) <sup>ab</sup>	2 (66,7%) <sup>b</sup>	3 (72,6%) <sup>b</sup>	2 (48,3%) <sup>a</sup>	3 (64,4%) <sup>b</sup>
IL-6	2 (63,2%) <sup>ac</sup>	2 (64,6%) <sup>a</sup>	2 (49,9%) <sup>bc</sup>	2 (64,7%) <sup>a</sup>	2 (50,8%) <sup>b</sup>	2 (65,4%) <sup>a</sup>
TNF-α	2 (52,1%) <sup>a</sup>	3 (73,5%) <sup>bc</sup>	3 (76,1%) <sup>bc</sup>	2 (69,7%) <sup>c</sup>	2 (56,6%) <sup>a</sup>	3 (80,6%) <sup>b</sup>
TLR-4	3 (74,7%) <sup>a</sup>	2 (64,4%) <sup>a</sup>	3 (71,1%) <sup>a</sup>	2 (59,9%) <sup>a</sup>	2 (61,5%) <sup>a</sup>	2 (69,8%) <sup>a</sup>
TRIF	3 (83,9%) <sup>a</sup>	2 (62,4%) <sup>bc</sup>	3 (71,4%) <sup>ac</sup>	2 (56,5%) <sup>bc</sup>	2 (67,3%) <sup>ac</sup>	2 (49,4%) <sup>b</sup>
IRF-3	2 (49,0)% <sup>a</sup>	2 (66,7%) <sup>ab</sup>	3 (71,3%) <sup>b</sup>	3 (72,5%) <sup>b</sup>	3 (55,2%) <sup>ab</sup>	2 (73,0%) <sup>b</sup>
IFN-γ	2 (50,2%) <sup>a</sup>	2 (63,7%) <sup>ab</sup>	3 (74,7%) <sup>bc</sup>	3 (83,1%) <sup>c</sup>	2 (60,2%) <sup>ab</sup>	2 (66,4%) <sup>ac</sup>

Os valores correspondem a intensidade da imunomarcação por proteína por grupo (1 = fraca, 2 = moderada, 3 = intensa). Os valores entre parênteses são equivalentes à porcentagem média de células uroteliais positivas por grupo (n = 5 secções / animal / grupo). MyD88, TRIF, IRF-3, IFN- $\gamma$ : ANOVA, Teste de Tukey. TLR-2, IKK- $\alpha$ , NF $\kappa$ -B, IL-6, TNF- $\alpha$ , TLR-4: ANOVA Kruskal-Wallis, Teste de Student-Newman-Keuls. Na mesma linha, valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (p <0,05).



Figura 10: Imunomarcação comparando a Via TLR2 (via canônica) entre os diferentes grupos.

As figuras mostram as diferentes imunorreatividades das diferentes proteínas da via TLR2 comparando grupos experimentais: grupos Controle, Câncer, Câncer + OncoTherad® (MRB-CFI-1), Câncer + P14-16, Câncer + CFI-1 e Câncer + BCG. (A): TLR2; (B): MyD88; (C): IKKα; (D): NFκB; (E): IL-6; (F): TNFα. Barra de escala: 50 μm.

Figura 11: Imunomarcação comparando a Via TLR4 (via não-canônica) entre os diferentes grupos.



As figuras mostram as diferentes imunorreatividades comparando grupos experimentais: grupos Controle, Câncer, OncoTherad® (MRB-CFI-1), Câncer + P14-16, Câncer + CFI-1 e Câncer + BCG. (A): TLR4; (B): TRIF; (C): IRF-3; (D): IFNγ. Barra de escala: 50 μm.

# 4.4 O tratamento com OncoTherad® promoveu uma diminuição na imunorreatividade de RANK, do *checkpoint* PD-1/PD-L1 e de FOXP3

Os animais do grupo Câncer apresentaram maior imunorreatividade da proteína RANK em comparação ao grupo Controle (p<0,05). Níveis moderados de proteína RANK foram encontrados no grupo Câncer, que apresentaram 50,4% de células marcadas. Uma porcentagem semelhante de células positivas (55,5%) foi encontrada após o tratamento com a proteína P14-16 (**Tabela 5**). Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, em animais com CBNMI induzido quimicamente, após o tratamento com BCG e CFI-1, a expressão de RANK diminuiu em comparação ao grupo Câncer (**Tabela 5**).

Após o tratamento com OncoTherad®, a expressão da proteína RANK apresentou imunorreatividade fraca significativa (17,7%), semelhante aos valores expressos em animais saudáveis (grupo Controle). A expressão reduzida após o tratamento com OncoTherad® foi estatisticamente significativa em comparação ao tratamento com P14-16 (p<0,01), BCG (p<0,01) e Câncer (p<0,01). Os resultados podem ser confirmados na **Tabela 5** e na **Figura 12**.

A expressão de RANKL foi moderada em todos os grupos. Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, uma diminuição na imunorreatividade desta proteína, em valores absolutos, pode ser observada após o tratamento com P14-16 em comparação com os outros grupos. A porcentagem de células RANKL positivas foi menor após o tratamento com OncoTherad® (48,8%), em comparação com o grupo Câncer (**Tabela 5, Figura 12**). Os animais tratados com BCG apresentaram imunorreatividade moderada para essa proteína, igual ao grupo Controle.

Os níveis moderados de proteína FOXP3 foram encontrados em todos os grupos. Foi observado um aumento na imunorreatividade de FOXP3 em animais com CBNMI (grupo Câncer) em comparação com animais saudáveis (Grupo Controle), embora não estatisticamente significativo. No entanto, os animais tratados com OncoTherad® mostraram imunorreatividade reduzida para essa proteína em comparação com o grupo com Câncer. Já os animais tratados com CFI-1 e BCG

apresentaram imunorreatividade para FOXP3 muito semelhante aos animais do grupo Controle, conforme dados da **Tabela 5**, e imunomarcações na **Figura 12**.

A imunorreatividade de PD-1 / PD-L1 foi maior no grupo Câncer (62,3%) em comparação ao grupo controle, como esperado. Os animais tratados com OncoTherad® apresentaram menores valores de imunorreatividade dessa proteína e fraca intensidade, em comparação ao grupo Câncer (p<0,01), e aos tratamentos com P14-16 (p<0,01) e CFI-1 (p<0,01). Os grupos tratados com P14-16 e CFI-1 apresentaram imunorreatividade e intensidade semelhantes para essa proteína (**Tabela 5, Figura 12**), confirmando que o efeito combinado desses compostos, ao formar o Oncotherad®, é promissor.

**Tabela 5:** Média da intensidade de imunomarcação para os diferentes antígenos (RANK, RANKL, FOXP3 e PD-1/PD-L1) comparando os diferentes grupos de tratamento.

Grupos (n=6)						
Antígenos	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad® (MRB- CFI-1)	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG
RANK	1 (29,6%) <sup>ac</sup>	2 (50,4%) <sup>ab</sup>	1 (17,7%) <sup>c</sup>	2 (55,5%) <sup>b</sup>	2 (40,4%) <sup>bc</sup>	2 (48,1%) <sup>ab</sup>
RANKL	2 (50,2%) <sup>a</sup>	2 (51,1%) <sup>a</sup>	2 (48,8%) <sup>a</sup>	2 (44,8%) <sup>a</sup>	2 (54,3%) <sup>a</sup>	2 (50,7%) <sup>a</sup>
FOXP3	2 (58,2%) <sup>a</sup>	2 (67,4 %) <sup>a</sup>	2 (52,3%) <sup>a</sup>	2 (56,6%) <sup>a</sup>	2 (57,3%) <sup>a</sup>	2 (51,2%) <sup>a</sup>
PD-1/ PD-L1	1 (22,1%) <sup>ac</sup>	2 (62,3%) <sup>b</sup>	1 (25,2%) <sup>c</sup>	2 (53,3%) <sup>b</sup>	2 (53,4%) <sup>b</sup>	2 (41,8%) <sup>bc</sup>

Os valores correspondem a intensidade da imunorreatividade por proteína por grupo (1 = fraca, 2 = moderada, 3 = intensa). Os valores entre parênteses são equivalentes à média da porcentagem de células uroteliais positivas por grupo. ANOVA seguida pelo Teste de Tukey foi aplicada para RANK e PD-1 / PD-L1; e ANOVA Kruskal-Wallis para RANKL e FOXP3. Na mesma linha, valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (p <0,05).



Figura 12: Imunomarcação das proteínas RANK/ RANKL, FOXP3 e PD-1/PD-L1 nos diferentes grupos de tratamento.

As figuras mostram as diferentes imunorreatividades comparando os grupos de tratamento Controle, Câncer, Câncer\_OncoTherad®, Câncer+P14-16, Câncer+CFI-1 e Câncer+BCG. (A): RANK; (B): RANKL; (C): FOXP3; (D): PD-1 / PD-L1. Barra de escala: 50 µm.

# 4.5 Os resultados de *Western Blotting* confirmam que o OncoTherad® é uma imunoterapia que modula o checkpoint imunológico PD-1/ PD-L1

Os resultados de *Western Blotting* confirmaram os resultados de imunohistoquímica para o *checkpoint* imunológico PD-1 / PD-L1 (**Figura 13**).


**Figura 13:** Análise de Western Blotting de PD-1/PD-L1 da bexiga urinária dos camundongos dos diferentes grupos de tratamento.

Perfil de proteína representativo de cada grupo. O gráfico caracteriza a expressão relativa da densidade óptica integrada para a proteína, normalizada pela β-actina, e mostra a distribuição numérica dos dados e assimetria por meio da exibição dos quartis e médias dos dados. ANOVA Kruskal-Wallis seguida por Student-Newman Keuls. (\*) indica diferenças estatísticas significativas (p<0,05) em comparação com Câncer e BCG.

A expressão de PD-1 / PD-L1 foi intensa no grupo Câncer em comparação ao grupo Controle (p = 0,006). Após terapia com o imunomodulador OncoTherad®, esse *checkpoint* foi modulado e apresentou expressão fraca em comparação com Câncer (p = 0,02) e BCG (p = 0,0069). Curiosamente, após o tratamento com CFI-1 (a parte inorgânica do Oncotherad®), a expressão de PD-1 / PD-L1 também foi fraca, em comparação com Câncer (p = 0,04) e BCG (p = 0,014). Porém, o tratamento apenas com a parte orgânica (P14-16) não apresentou diferenças significativas em relação aos demais grupos. O BCG apresentou intensa expressão de PD-1 / PD-L1 em relação ao grupo Controle (p = 0,0019) e não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Câncer.

## 4.6 OncoTherad aumentou os níveis de p53 em relação ao grupo Câncer

O grupo Câncer apresentou menor proporção de células p53 positivas quando comparado aos demais grupos (p<0,05) (**Tabela 6, Figura 15**), os quais não

apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados entre si. Este resultado é confirmado pela intensidade da imunomarcação, na qual o grupo Câncer apresenta maior proporção de células negativamente marcadas (*negative*) comparados ao demais grupos (p<0,01) os quais não apresentam diferenças significativas entre si para esse grau de intensidade.

Células p53 fracamente (*low positive*) marcadas foram predominantes no grupo tratado com P14-16, o qual apresentou diferenças significativas em relação ao grupo Câncer (p<0,05) e grupo tratado com OncoTherad® (p<0,01). A proporção de células moderadamente marcadas (*positive*) foi menor no grupo Câncer em comparação aos demais (p<0,01), e maior no grupo tratado com OncoTherad® em relação ao tratamento com BCG (p<0,01) e P14-16 (p<0,01), porém, muito semelhante ao grupo Controle. No entanto, a intensidade de marcação forte (*high positive*) foi a menos predominante em todos os grupos, não diferindo entre eles.

Apesar de em todos os grupos de células fracamente marcadas (*low positive*) serem predominantes, o grupo câncer chamou atenção devido ao fato de apresentar as maiores proporções de células negativas para p53 (*negative:* 42,7%) e no grupo tratado com Oncotherad® predominarem células moderadamente marcadas (*positive:* 40,6%) além das fracamente marcadas (*low positive:* 40,8%). Os dados podem ser confirmados na **Figura 14**.

Em relação à porcentagem de núcleos positivos para p53, os grupos câncer e tratados com P14-16 e CFI-1 apresentaram as menores proporções comparados aos demais grupos (p<0,05), os quais não diferiram entre si (**Tabela 7**).

**Tabela 6**: Imunorreatividade total da proteína p53 nos diferentes grupos de tratamento.

			Grupos (n=6)			
Antígenos	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad® (MRB- CFI-1)	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG
p53	80,3% (1)	57,3% (0/1) <sup>a</sup>	86,5% (1/2)	82,8% (1)	82,6% (1)	74,2% (1)

Os valores são equivalentes à média da porcentagem de células uroteliais positivas por grupo. Os valores entre parênteses correspondem à intensidade por proteína por grupo (0: ausente – *negative*; 1: fraca – *low positive*, 2: moderada – *positive*; 3: intensa – *high positive*). ANOVA seguida pelo Teste de Tukey foi aplicada. Na mesma linha, valores seguidos da letra "a" indica diferença estatísticas com os demais grupos (p <0,05).

**Tabela 7:** Proporção de Núcleos p53 Positivos (%).

		-	Grupos (n=6)			
Antígenos	Controle	Câncer	Câncer + OncoTherad® (MRB- CFI-1)	Câncer + P14-16	Câncer + CFI-1	Câncer + BCG
p53	53,8% <sup>b</sup>	35,9%ª	52,1% <sup>b</sup>	32,7% <sup>a</sup>	38,3% <sup>a</sup>	66,5% <sup>b</sup>

Os valores são equivalentes à média da porcentagem de núcleos de células uroteliais positivos por grupo. ANOVA seguida pelo Teste de Tukey foi aplicada. Na mesma linha, valores seguidos de letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (p <0,05). **Figura 14:** Gráfico das Categorias de Intensidade da Imunomarcação da proteína p53 comparativa entre os grupos.



Os valores correspondem à média da intensidade da imunomarcação da proteína Ki-67 por grupo (0: ausente – *negative*; 1: fraca – *low positive*, 2: moderada – *positive*; 3: intensa – *high positive*). ANOVA Two Way foi aplicada. Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre os grupos para a categoria de intensidade de marcação.



Figura 15: Imunomarcação representativa da proteína p53 nos diferentes grupos de tratamento.

As figuras mostram as diferentes imunorreatividades da proteína p53 comparando os grupos e tratamentos: Controle, Câncer, Câncer+OncoTherad®, Câncer+P14-16, Câncer+CFI-1 e Câncer+BCG. **Barra de escala: 20 µm**.

## 5. DISCUSSÃO

As análises macroscópicas do trato urinário dos camundongos indicam que não houve toxicidade aguda devido aos tratamentos nas doses utilizadas, o que pode ser confirmado, principalmente, pela ausência de lesões renais macroscópicas ou hidronefrose, visto que alterações renais são comuns em estudos pré-clínicos de toxicidade de fármacos (Frazier et al., 2012). Os autores também confirmam que a dilatação dos ureteres ou hidroureter pode ocorrer após urolitíase espontânea ou induzida pela administração de fármacos (Frazier et al., 2012), contudo não foram constatados cálculos visíveis nos camundongos tratados do presente estudo.

Entretanto, lesões na bexiga urinária são mais frequentes devido ao maior tempo de contato da urina no interior da bexiga urinária em comparação com a uretra ou ureteres de roedores, nos quais as lesões são mais raras devido à rápida passagem da urina nessas estruturas (Frazier et al., 2012).

Alguns animais tratados com OncoTherad® apresentaram a vascularização um pouco aumentada, assim como os tratados com P14-16 e BCG. A aparência mais edematosa e avermelhada (hiperemia) das bexigas urinárias devido à dilatação de vasos sanguíneos é descrita em casos de cistite aguda em camundongos da mesma linhagem que o presente estudo (Ambite et al., 2016), e podem ser indicativos de estimulação de um quadro inflamatório após os tratamentos. Sabe-se que a inflamação pode ser considerada um fator importante na regressão tumoral, ativando mecanismos efetores imunológicos (Galli et al., 2010; Mantovani et al., 2008).

A parede da bexiga urinária espessada pode indicar neoplasia, principalmente espessamentos focais, e quando ocorre de forma difusa e/ou regular, geralmente está relacionada a condições benignas como cistite, fibrose ou ainda, como efeito dos tratamentos intravesicais (Cohan et al., 2009; Nicolau et al., 2009). No presente trabalho, os espessamentos encontrados nas bexigas urinárias podem ser decorrentes de neoplasias ou podem ser indicativos da ocorrência de inflamação aguda ou cistite causadas pelos tratamentos. No entanto, foi possível observar diferenças no espessamento da bexiga dos animais do Grupo Câncer, enquanto o espessamento nítido na parede das bexigas urinárias não apresentava a mesma característica da maioria dos animais tratados, especialmente os tratados com OncoTherad® e com BCG.

Em um estudo com ratas *Fischer* 344, Pan et al. (2001) descreveram a presença de espessamento da parede da bexiga devido à inflamação, infiltrado imune e edema na lâmina própria como também hiperplasia urotelial, detectados histologicamente. A presença de espessamento da parede da bexiga urinária associada à hiperemia em humanos é encontrada em casos de cistite cística ou glandular, cistite eosinofílica e displasia (Gurbuz e Salvarci, 2020). Alterações nos constituintes da urina também podem afetar superficialmente o urotélio e provocar espessamento (Frazier et al., 2012).

Os resultados histopatológicos descritos no presente estudo, para o modelo de indução química de CBNMI com N-Etil-N-nitrosoureia (ENU), exibiram lesões iguais às encontradas por Garcia et al. (2016). Foi possível verificar que a indução com ENU também é eficaz e semelhante à com MNU. Após a indução do câncer de bexiga, 100% dos animais apresentaram lesões características de câncer de bexiga nãomusculo invasivo, bem como lesões malignas pTis, pTa e pT1, semelhantes às encontradas por Fávaro et al. (2012). A regressão tumoral ocorreu na maioria das lesões após o tratamento com BCG, assim como nos experimentos realizados por Fávaro et al. (2012) e Garcia et al. (2015; 2016), os quais também mostaram regressão tumoral significativa após o tratamento com BCG.

O presente estudo confirmou que os tumores da bexiga urinária, especialmente o CBNMI, apresentam expressão diminuída de TLRs (Ayari et al., 2011; Stopiglia et al., 2015). O grupo Câncer apresentou imunorreatividade moderada de TLR2 e TLR4 grupo controle relação ao (animais saudáveis), que apresentaram em imunorreatividade intensa. A imunoterapia mediada por TLRs com Bacillus Calmette-Guérin (BCG) para o tratamento do CBNMI é uma estratégia de sucesso para esse tipo de tumor. Na maioria dos pacientes que foram tratados com BCG intravesical, foi encontrado infiltrado linfocítico local e produção de citocinas inflamatórias na bexiga, o que caracterizou uma resposta imune local complexa (Sander et al., 1996; Yu et al., 2007). Nossos achados em camundongos com CBNMI-induzido e tratados com BCG mostraram o mesmo padrão. O ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) é produzido por neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) por meio da estimulação da expressão de TLR2 após o tratamento com BCG (Steinberg et al., 2011). No presente estudo, os animais tratados com BCG apresentaram intensa imunorreatividade para TNF-α.

Garcia et al. (2016) também demonstraram em experimentos com ratos com CBNMI-induzido, que a imunoterapia BCG intravesical aumentou os níveis de proteínas de TLR2 e TLR4, com um consequente aumento nos níveis de MyD88, IKKα e NF-kB, resultando em aumento de IL-6 e TNF-α. Esses mesmos autores concluíram que a ativação do sistema imune local por meio do tratamento com BCG intravesical via MyD88 foi essencial para reduzir a progressão tumoral nesses animais. A ativação de TLR4 em macrófagos resulta na síntese de várias citocinas inflamatórias que restringem o crescimento tumoral. Em resposta a ligantes de microorganismos patogênicos ou após lesão tecidual, a ativação e manutenção da sinalização de TLRs frequentemente resulta em inflamação sistêmica e localizada, coagulopatia disseminada, reparo de ferida exuberante, cicatrização excessiva e fibrose (McKeown-Longo e Higgins, 2017).

No presente trabalho, foi possível observar que o tratamento convencional para o CBNMI com BCG intravesical, estimulou a via canônica, aumentando a imunorreatividade dos componentes da via TLR2 e aumentando a produção de citocinas inflamatórias. Os níveis de proteína TLR2 mostraram-se aumentados após o tratamento com BCG, o que corroborou com os estudos anteriores de Garcia et al. (2015; 2016). A via dependente de MyD88 foi induzida, o que é confirmado por níveis aumentados das proteínas MyD88, IKKα e NF-kB. A indução da via canônica (ou via dependente de MyD88) aumenta a imunorreatividade de IL-6 e TNF-α, que são citocinas inflamatórias. Consequentemente, a ativação do sistema imunológico pelo tratamento com BCG, através da via dependente de MyD88, foi importante para o reparo histopatológico do câncer após o tratamento com BCG. Além disso, apesar de em números relativos não apresentaram significância, os valores absolutos da imunorreatividade de TLR4 também se mostraram aumentados.

Já no grupo tratado com OncoTherad® (MRB-CFI-1) a via não-canônica (TLR4, TRIF, IRF3 e IFNγ) apresentou intensa imunorreatividade. TLR4 é membro de uma família de 10 receptores de reconhecimento de padrões humanos inicialmente implicados na regulação do sistema imunológico inato. O TLR4 também pode ser ativado por vários componentes endógenos liberados após uma lesão (Zeuke et al., 2002; Gerwirtz, 2003; Hasan et al., 2005). A ativação de TLR4 por DAMPs, derivados de matriz extracelular (ECM), induz a expressão de genes fibroinflamatórios que promovem a remodelação tecidual normal, além do reparo de feridas. A inflamação excessiva e sustentada resulta em cicatrização prejudicada (Qian et al., 2016). A associação de TLR4 com proteínas acessórias distintas ou co-receptores pode ditar a montagem de ligantes específicos de TLR4, adaptando assim a resposta inflamatória para atingir resultados biológicos específicos (Kelsh et al., 2014; Piccinini et al., 2016).

A produção de várias citocinas inflamatórias que predispõem o crescimento tumoral é resultado da ativação de macrófagos hospedeiros pelo TLR4. Por outro lado, a sinalização de TLR4 também estimula citocinas (IFN) que promovem efeitos antitumorais por estimulação de TRAIL, um poderoso indutor de morte de células tumorais (Luo et al., 2004), corroborando os resultados encontrados no presente estudo para IFN. Shankaran et al. (2001) demonstraram em seus estudos, que a função supressora de tumor do sistema imunológico é crucial na dependência das ações do IFN-γ que, pelo menos em parte, são gerenciadas para controlar a imunogenicidade das células tumorais. O IFN-y aumenta várias vias bioquímicas antiproliferativas e tumoricidas em macrófagos e linhagens de células tumorais, além de ter um impacto profundo no crescimento de tumores sólidos e metástases e aparentemente desempenha um papel inicial na proteção contra metástases (Martini et al., 2010; Alshaker et al., 2011; Tate et al., 2012). Komita et al. (2006) e Martini et al., (2010) demonstraram em seus estudos que o IFN-y gerado por células T CD8+ infiltrantes de tumor ativadas por IL-12 induziam diretamente a apoptose de células de carcinoma hepatocelular de camundongo. Já Shankaran et al. (2010) demonstraram que o IFN-y gerado por células T infiltrantes de tumor pode desempenhar dois papéis diferentes na atividade antitumoral: indução de células T antitumorais e ação tumoricida direta estimulando a sintetase de óxido nítrico induzível (iNOS).

O mecanismo imune inato para detecção de tumores que conduzem a respostas adaptativas de células T continua indefinido, embora interferons (IFNs) estejam envolvidos neste processo (Woo et al., 2014). Woo et al. (2014) identificaram que a ativação espontânea de células TCD8 + contra tumores não era confiável em camundongos sem o complexo de interferon do gene do fator estimulante (STING), porém não em outras vias de sinalização inatas, propondo o envolvimento de uma via de descoberta do DNA citosólico. *In vitro*, a produção de IFN e a ativação de células dendríticas foram desencadeadas por DNA derivado de células tumorais por meio de STING e IRF-3 (Woo et al., 2014). No microambiente tumoral *in vivo*, o DNA da célula

tumoral foi identificado dentro das células apresentadoras de antígeno do hospedeiro, que se conectaram com a ativação da via STING e a produção de IFN (Woo et al., 2014). Assim, Woo et al. (2014) demonstraram que o principal mecanismo para a imunidade inata detectar o câncer é por meio da via do hospedeiro STING, o que representa uma importante implicação para a imunoterapia contra o câncer.

Nesse sentido, o OncoTherad® (MRB-CFI-1) mostrou-se um potencial imunomodulador no tratamento do CBNMI, reduzindo 100% da progressão tumoral. Isso foi possível por meio da estimulação da via não-canônica, aumentando a imunorreatividade dos componentes da via TLR4 (TLR4, TRIF e IRF3), levando à ativação de IFN. Por outro lado, os tratamentos com seus compostos orgânico (P14-16) e inorgânico (CFI-1) não demonstraram efeitos satisfatórios na inibição da progressão tumoral, quando usados separadamente. Esses compostos apresentaram padrões distintos de imunorreatividades para as proteínas das vias TLRs em comparação aos animais saudáveis (Controle) e do grupo Câncer. Entretanto, quando associados para formar o OncoTherad®, mostaram resultados favoráveis no que diz respeito à imunomodulação da via TLR e redução da progressão do CBNMI.

No que concerne à expressão do eixo RANK/RANKL, estudos têm demonstrado que diversos tecidos neoplásicos apresentam expressão aumentada dessas proteínas (Mori et al. 2006; Santini et al. 2011a; 20011b; Chawla et al. 2013; Li et al. 2014; Pfitzner et al. 2014; Park et al. 2014; Groot et al. 2018; Wu et al. 2020). Essa ampla distribuição reforça a teoria de seu papel no processo oncogênico. Uma elevada porcentagem de células de tumores sólidos e câncer de mama expressam mRNA/proteína RANK em vários níveis (Santini et al. 2011a; 2011b). Cerca de 89% de todos os carcinomas avaliados apresentaram imumarcação postiva para RANK e cerca de 60% dos casos mostraram mais de 50% de células cancerosas positivas (Renema et al. 2016). Curiosamente, a expressão de RANK em células de carcinoma é um marcador de mau prognóstico, conforme demonstrado no câncer de mama (Heymann et al. 2008; Park et al. 2014). Pfitzner et al. (2014) verificaram a relação entre a maior expressão de RANK no tumor primário de mama e uma maior sensibilidade à quimioterapia, semelhante aos cânceres de próstata. Além disso, um maior risco de recorrência e morte, independentemente desta maior sensibilidade (Pfitzner et al. 2014). A sinalização RANK / RANKL parece estar envolvida na iniciação, progressão e metástase do tumor (Renema et al. 2016).

Já o seu ligante, RANKL, influencia o microambiente das células tumorais, agindo na imunidade local. Experimentos com camundongos *knockout* para RANKL foram cruciais para identificar o papel principal do RANKL no sistema imunológico. Kong et al. (1999) descreveu o comprometimento dos órgãos linfóides nesses camundongos *knockout*, especialmente os nódulos linfáticos (Mueller e Hess 2012; Ahern et al. 2018). Além do comprometimento a nível "dominante", no qual a maturação das células do timo, necessária para o desenvolvimento das células T, foi afetada (Akiyama et al. 2008; 2013; Iria 2021) (Akiyama et al. 2008; 2013; Iria 2021).

No presente estudo, os resultados para o CB mostraram semelhança com os outros tipos de câncer. Cerca de 50,4% das células cancerosas foram positivas para RANK. Trieb e Windehager (2015) relataram que a expressão de RANK é indicativa de um prognóstico negativo em relação à sobrevida livre de doença. O tratamento com OncoTherad® promoveu diminuição da imunorreatividade de RANK, com 17,7% de células positivas. Esses resultados são promissores em relação ao tratamento convencional com BCG, que apresentou 45,1% de células positivas. RANKL também pode induzir diretamente fatores quimioatrativos e invasivos para aumentar o crescimento e a invasão das células tumorais (Chen et al. 2006). Em nosso estudo, a expressão de RANKL não apresentou redução significativa após os tratamentos em comparação ao grupo Câncer. No entanto, os resultados obtidos para esta proteína após os tratamentos foram muito semelhantes aos do grupo Controle. Fávaro et al. (2019), em estudo com ratas *Fischer*, demonstraram que a imunoterapia com OncoTherad®, além de ativar as vias TLR2 e TLR4 no câncer de bexiga, também é capaz de modular o sistema RANK / RANKL, confirmando nossos achados.

As células imunes podem caracterizar uma subseção de células que expressam RANKL que intermediam efeitos diretos da sinalização de RANK / RANKL no câncer (David et al. 2011; Wan et al. 2013). Essas células são frequentemente encontradas no microambiente tumoral, então suas funções exatas são diversas e não completamente compreendidas (David et al. 2011; Wan et al. 2013).

O complexo papel da sinalização de RANK / RANKL é devido ao seu envolvimento na geração e regulação de respostas imunes, no sentido que a sinalização de RANK / RANKL pode aumentar e suprimir a imunidade e impactar sobre a inflamação, a ativação de células T e a evasão imunológica (Wittrant et al. 2004; David et al. 2011; Wan et al. 2013). A sinalização RANK/RANKL mantém a sobrevivência e função das células dendríticas, ativação de macrófagos M1 e diferenciação e ativação de células T (Wittrant et al. 2004; David et al. 2011). Também está envolvida na tolerância central e periférica (David et al. 2011; Wan et al. 2013) e no desenvolvimento de linfonodos (Theoleyre et al. 2004). RANKL também participa da regulação do desenvovlimento inicial de linfócitos (Theoleyre et al. 2004; David et al. 2011). A sinalização RANK/RANKL é necessária para o desenvolvimento de células T centralmente por meio da expressão do gene regulador autoimune (Aire), relacionado à supressão de respostas imunes (David et al. 2011; Zhao et al. 2018; Sobacchi et al. 2020).

A expressão de RANK e RANKL é amplamente separada entre as células do sistema imunológico (Wan et al. 2013). RANKL é expresso principalmente em células T e é regulado positivamente após estimulação de células T, melhorando a proliferação e função das células T. Em contrapartida, RANK é expresso em monócitos, macrófagos e células dendríticas e é gerada por células T e células *natural killers* (NK) por citocinas específicas (David et al. 2011; Wan et al. 2013). As evidências sugerem que RANK pode atuar cooperativamente com a molécula coestimuladora CD40 na ativação mediada por células dendríticas de respostas de células T (David et al. 2011). A interrupção da sinalização RANK/RANKL pode ser antagonista da função das células dendríticas e das respostas imunes mediadas por células T (Jones et al., 2016).

A sinalização de RANK/ RANKL é significativa na imunologia tumoral e estimula ou suprime as respostas imunes antitumorais no câncer, embora não seja totalmente compreendida (David et al. 2011; Wan et al. 2013). Essas sinalizações podem contribuir para o desenvolvimento de um microambiente imunológico tolerogênico em tumores (Mori et al. 2007; Chuang et al. 2009; Hu et al. 2014). RANK é amplamente expresso em macrófagos associados a tumor (TAMs) e RANKL por células T que se infiltram em tumor (Wan et al. 2013). Linfócitos Tregs estão envolvidos na inibição da atividade das células T efetoras e podem desempenhar um papel na evasão imune do tumor (Lee et al. 2011), como argumentado, RANKL é importante para a expansão de Tregs em diferentes condições. Em se tratando do sistema complexo de receptores e ligantes envolvidos no controle e ativação de células T, PD-L1 tem mostrado desempenhar papel crucial na indução e manutenção de Tregs que leva ao aumento destes no microambiente tumoral e estes Tregs induzidos (iTregs) inibem as respostas das células T ao tumor (Francisco et al., 2009; Ni et al., 2012). PD-L1 é uma proteína transmembrana tipo 1 (B7-H1) da família de ligantes B7 e pode ser expressa em ambas as células hematopoiéticas (células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células T e linfócitos B) e células não hematopoiéticas, incluindo células endoteliais, epiteliais e tumorais (Rebelatto et al. 2016; Yu et al. 2016; Taube et al. 2018).

A expressão de PD-L1 em células tumorais induz a regulação negativa e autotolerância do sistema imunológico de rejeitar o tumor, eliminando a atividade inflamatória das células T por meio da ligação ao receptor regulador de células T, o PD-1 (Sharpe et al. 2007; Frega et al. 2019). Entre os ligantes pertencentes à família B7, PD-L1 é o principal ligante inibidor de membrana (Sun et al. 2006; Taube et al. 2018). A regulação positiva de PD-L1 mostrou-se aumentada em várias doenças e foi associada ao estado clínico e patológico de pacientes com tumores sólidos (Droeser et al. 2013; Chen et al. 2012; Hamanishi et al. 2007). Estudos anteriores confirmaram a alta expressão de moléculas de PD-L1 por ambas as células tumorais e células imunes infiltrantes, e sua inibição resultou em uma resposta clínica de longo prazo em tumores sólidos (Herbst et al. 2014; Powles et al. 2014; Brahmer et al. 2012; Hodi et al. 2010).

A regulação positiva de PD-L1 tem sido descrita em várias malignidades e tem sido associado ao estado clínico-patológico de pacientes com tumores sólidos (Hamanishi et al., 2007; Chen et al., 2012; Droeser et al., 2013). A ampla expressão do PD-L1 avaliada, retrospectivamente, em microambientes tumorais e sua relação com parâmetros clínicopatológicos conduziram os estudos desta via regulatória de sinalização como potencial alvo terapêutico antineoplásico (Zou e Chen, 2008; Homet-Moreno e Ribas, 2015).

Entre as neoplasias humanas, nas quais a investigação da imuno-histoquímica da expressão de PD-L1 com valor prognóstico indubitável de resposta às terapias anti-PD-1 disponíveis, foram validadas por estudos clínicos, os carcinomas pulmonares de células não pequenas e os carcinomas uroteliais da bexiga (Cree et al. 2016; Chae et al. 2016; Gandini et al. 2016; Kerr and Nicolson. 2016). No presente estudo com CBNMI, a imunomarcação de PD-1 / PD-L1 mostrou uma diminuição significativa após o tratamento com OncoTherad® quando comparada a todos os grupos, especialmente em relação ao grupo Câncer. Estudos prévios demonstraram que PD-L1 era fortemente expresso, tanto por células tumorais, quanto por células imunes infiltrantes, e sua inibição resultava em uma resposta clínica duradoura em ensaios clínicos recentes de vários tumores sólidos (Hodi et al., 2010; Brahmer et al., 2012; Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014).

Muenst et al. (2014) avaliaram a expressão de PD-1/ PD-L1 em linfócitos de infiltrado inflamatório de 660 casos de câncer de mama e concluíram que a expressão de PD-L1 foi correlacionada a pior sobrevida global. Dados de pesquisas clínicas que avaliaram inibidores de PD-1 / PD-L1 em melanoma e carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC) sugeriram que a expressão de PD-L1 está associada a maior taxa de resposta e demonstrou segurança e respostas clínicas duráveis associadas a essas drogas (Aerts et al. 2013). A importância clínica da inibição do eixo PD-1/PD-L1 como uma opção de imunoterapia contra o câncer eficaz está sendo avaliada em vários estudos. Alguns estudos já foram publicados mostrando aumento da sobrevida global em comparação com a terapia padrão para o tratamento do melanoma (Robert et al. 2015).

Nossos resultados também confirmam esses dados para o câncer de bexiga urinária. As análises imuno-histoquímicas e de *western blotting* mostraram expressão aumentada de PD-1/PD-L1 no grupo Câncer. Além disso, a diminuição da imunorreatividade dessas proteínas levou a um melhor prognóstico nos animais tratados com OncoTherad®, que se mostrou uma potencial opção terapêutica para esse tipo de câncer, por meio da diminuiçãode PD-L1, promovendo resultados ainda mais satisfatórios em relação ao tratamento convencional com BCG. Nossos dados também confirmam que a porção protéica do imunomodulador (P14-16), separada do composto inorgânico (CFI-1), não apresenta efeitos tão satisfatórios quanto a sua associação.

Compreender as causas moleculares da resposta à imunoterapia no câncer é atualmente um dos mais importantes campos de pesquisa em oncologia. Portanto, vários outros biomarcadores além de PD-L1 estão sendo avaliados para prever melhores resultados para a imunoterapia (Taube et al. 2018). Pesquisas clínicas envolvendo terapias que promovem a inibição de moléculas co-inibidoras de *checkpoints* imunológicos (como PD-1 / PD-L1) têm mostrado altas taxas de resposta tumoral em melanoma e câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma gástrico, câncer de cabeça e pescoço e carcinoma urotelial (Brahmer et al. 2012; Taube et al. 2014; Garon et al. 2015; Taube et al. 2018). A expressão de PD-L1 foi sugerida como um biomarcador potencial de resposta a esses tratamentos (Taube et al. 2018). Nesse sentido, pode-se entender que o tratamento com OncoTherad® é eficaz para o CBNMI, demonstrando vantagens significativas em comparação ao tratamento convencional com BCG, o qual apresentou imunorreatividade para o *checkpoint* imunológico PD-1/ PD-L1 muito semelhante à do grupo Câncer.

Evidências também sugerem que PD-L1 desempenha um papel crucial na indução e manutenção de Tregs. O aumento de Tregs no microambiente tumoral induz Tregs (iTregs) a interromper as respostas das células T ao tumor (Ni et al. 2012; Francisco et al. 2009). Li et al. (2016) em um estudo com câncer de mama, disserta sobre a correlação entre a expressão de PD-L1 em células tumorais e a infiltração de Treg FOXP3 positivas no microambiente tumoral. Os resultados indicaram a possibilidade de que os sinais de PD-L1 sejam importantes para suprimir a resposta imune por meio da regulação de Treg no câncer de mama (Brahmer et al. 2012; Emens et al. 2015). Ensaios clínicos em andamento visando a potencial via PD-1 / PD-L1 mostraram que os supressores de PD-L1 são seguros, bem tolerados e têm poucos efeitos colaterais autoimunes (Brahmer et al. 2012; Emens et al. 2015).

No presente estudo, PD-1/ PD-L1 e FOXP3 exibiram seus níveis mais altos em associações com o pior diagnóstico em modelos de camundongos com CBNMI induzidos quimicamente. A avaliação mútua identificou que os animais com presença concomitante de alta expressão de PD-L1 e alta infiltração de FOXP3 + Treg tiveram o pior diagnóstico. Uma estratégia combinada para bloquear o eixo PD-L1 / PD-1 com depleção associada de Tregs deve ser razoável para aumentar a eficácia terapêutica. Os benefícios potenciais deste modelo foram demonstrados em um estudo recente de carcinoma de células renais em camundongos, que mostrou imunidade protetora de longo prazo e regressão tumoral completa enquanto tal modalidade terapêutica era aplicada (Li et al. 2016).

Resultado descritos por Li et al. (2016) no câncer de mama, foram muito semelhantes aos achados no presente estudo com câncer de bexiga. Ambos demonstraram que as células tumorais apresentaram alta expressão de PD-1 / PD-L1 e tendência aumentada para infiltração de Treg FOXP3 + no tecido, sugerindo que PD-L1 e Tregs FOXP3 + atuam sinergicamente ou participam da mesma via molecular e suas expressões reguladas positivamente poderiam promover a evasão imunológica do tumor. Os resultados indicam que OncoTherad® é uma imunoterapia, que promove efeitos concomitantemente PD-1/ PD-L1 e Tregs FOXP3 + no tratamento do CBNMI, provando ser uma imunoterapia eficaz para o tratamento do câncer de bexiga.

As análises dos biomarcadores moleculares Ki-67 e p53 demonstraram que o OncoTherad® tem papel importante no aumento da expressão de p53 em relação ao tratamento convencional com BCG, podendo ser um dos mecanismos desse imunoterápico para evitar que linhagens de células cancerígenas se multipliquem.

A maioria dos genes de TLRs responde a p53 por meio de locais de ligação ao promotor ativando as vias canônica e não canônica (Menendez et al., 2011). A proteína p53 é responsável pela regulação do ciclo celular e atua como supressora de tumor (Shariat et al., 2009; Menendez et al., 2011). Estudos de sequências de promotores de elementos de resposta direcionados por p53 sugerem um papel geral como regulador de danos ao DNA e como um controle da expressão de genes de TLRs (Shariat et al., 2009). Além disso, vários estudos sugeriram que a terapia antiangiogênica é sensível ao status do p53 em tumores, indicando um papel importante na regulação da angiogênese (Folkman, 2006; Teodoro et al., 2006).

Em um estudo com o imunomodulador P-MAPA, Garcia et al. (2016) também observaram um aumento significativo nos níveis da proteína p53 e aumento da apoptose, através de níveis elevados da proteína p53 nos grupos Controle e tratados com P-MAPA e com BCG, confirmando, assim nossos achados. Além disso, a morte celular pode depender de vias de sinalização estimuladas por óxido nítrico (ON) que leva à expressão gênica, envolvendo o supressor de tumor p53 (Benhar Stamler, 2005; Zeine et al., 2006; Lim et al., 2009). A ativação de p53 por ON foi observada em muitos tipos de células (Wang e Chen, 2003; Wang et al., 2012). O p53 controla um número notável de funções fisiológicas, incluindo metabolismo energético, diferenciação e produção de espécies reativas de oxigênio e é ativado em resposta a

diversos sinais de estresse, como dano ao DNA, hipóxia, ativação de oncogene, drogas, depleção de nucleotídeos (Zeine et al., 2006).

As células que possuem uma via p53 totalmente funcional podem tanto interromper quanto reparar danos causados por esses estresses prematuros ou sofrem apoptose dependente de p53. Por meio do aumento da retenção nuclear de p53, o ON pode sensibilizar as células tumorais à apoptose dependente de p53. Vários estudos sugerem que a terapia antiangiogênica é sensível ao status de p53 em tumores, demonstrando seu papel na regulação da angiogênese (Dameron et al., 2001; Folkman, 2006; Teodoro et al., 2006). Outras evidências surgerem que o p53 do tipo selvagem poderia evitar que tumores incipientes se tornassem angiogênicos (Zhang et al., 2000). Teodoro et al. (2006) demonstraram que a supressão do tumor foi mediada por p53 em parte por pelo menos dois potentes inibidores da angiogênese, endostatina e tumstatina.

A indução da via de sinalização do interferon e o aumento dos níveis da proteína p53 do tipo selvagem por P-MAPA levaram a importantes efeitos antitumorais, não apenas suprimindo a proliferação celular anormal, mas também evitando a expansão contínua da massa tumoral por meio da supressão da angiogênese (Garcia et al., 2016). Nossos resultados sugerem que o OncoTherad® pode atuar da mesma maneira, porém mais estudos são necessários, em especial para avaliação de marcadores angiogênicos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O tratamento com OncoTherad reduziu em 100% a progressão tumoral, mostrando-se mais eficiente em relação ao tratamento com BCG, o qual reduziu a progressão em apenas 66,7%;
- Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam que o CBNMI tende a diminuir a expressão de TLRs;
- O tratamento convencional com BCG estimulou a via canônica, através do aumento da imunorreatividade dos componentes da via TLR2, aumentando a produção de citocinas inflamatórias;
- O OncoTherad® mostrou-se um potencial imunomodulador no tratamento para o CBNMI, diminuindo 100% da progressão tumoral, através da ativação da via não-canônica, aumentando a imunorreatividade dos componentes da via TLR4, levando à estimulação da produção de IFN;
- OncoTherad apresentou imunorreatividade reduzida de RANK e RANKL em relação ao câncer, o que é indicativo de bom prognóstico, principalmente no que diz respeito a metástases;
- OncoTherad apresentou imunorreatividade reduzida para PD-L1, podendo ser considerado um imunomodulador através da inibição de linfócitos Tregulatórios FOXP3+ e consequente aumento de linfócitos Tcitotóxicos, o que é confirmado pela diminuição da imunorreatividade a FOXP3;
- As partes orgânica (P14-16) e inorgânica (CFI-1) que compõe o OncoTherad (MRB-CFI-1) não apresentaram redução satisfatória da progressão tumoral quando avaliados separadamente, e mostraram padrões distintos de imunorreatividade para todas as vias analisadas quando compara-se os animais tratados com esses compostos aos animais saudáveis e ao câncer, porém, quando associados (MRB-CFI-1) apresentam resultados promissores na imunomodulação e diminuição da progressão do CBNMI;
- OncoTherad® tem papel importante no aumento da expressão de p53 em relação ao tratamento convencional com BCG, podendo ser um dos mecanismos desse imunoterápico para evitar que linhagens de células cancerígenas se multipliquem.

## REFERÊNCIAS

Aerts J., Lievense L., Hoogsteden H., Hegmans J. (2013) Immunotherapy prospects in the treatment of lung cancer and mesothelioma. Transl. Lung Cancer Res. 3; 34-45.

Ahern E., Smyth M.J., Dougall W.C., Teng M.W.L. (2018) Roles of the RANKL–RANK axis in antitumour immunity — implications for therapy. Nature Rev. Clin. Oncol. 15; 676-693.

Akira S., Takeda K. (2004) Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 4, 499–511.

Akiyama T., Shimo Y., Yanai H., Qin J., Ohshima D., Maruyama Y., Asaumi Y., Kitazawa J., Takayanagi H., Penninger J.M., et al. (2008) The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. Immunity. 29, 423–437.

Akiyama T., Shinzawa M., Qin J., Akiyama N. (2013) Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases. Front. Immunol. 4, 249.

Allavena P., Garlanda C., Borrello M.G., Sica A., Mantovani A. (2008) Pathways connecting inflammation and cancer. Curr Opin Genet Dev. 18, 3-10.

Alshaker H.A., Matalka K.Z. (2011) IFN- $\gamma$ , IL-17 and TGF- $\beta$  involvement in shaping the tumor microenvironment: the significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. Cancer Cell Int. 11, 33.

Ambite I., Puthia M., Nagy K., Cafaro C., Nadeem A., Butler D.S., Gustav R., Filenko N.A., Wullt B., Miethke T., Svanborg C. (2016) Molecular basis of acute cystitis reveals susceptibility genes and immunotherapeutic targets. PLoS Pathogens. 12, (10).

American Cancer Society (2021) Overview: bladder cancer. In: What are the key statistics about bladder cancer? American Cancer Society, Atlanta. Avalable in: http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-key-statistics. Acesso: 02/05/2021.

Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T cell growth and dendritic cell function. Nature. 390, 175–179.

Andreas B.O. Brandau S. (2003) Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin imunotherapy for superficial bladder cancer. J Urol. 170, 964–969.

Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. (2017). Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. Eur Urol 71; 96–108.

Askeland E.J., Newton M.R., O'Donnell M.A., Luo Y. (2012) Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. Adv Urol. 181987.

Ayari C., Bergeron A., Larue H. (2011) Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. J Urol. 185; 1915-1921.

Babjuk, M., Oosterlinck W., Sylvester R., et al. (2008) EAU guidelines on non-muscleinvasive urothelial carcinoma of the bladder. Eur Urol. 54, 303-314. Bago-Horvath Z., Schmid K., Rössler F., Nagy-Bojarszky K., Funovics P., Sulzbacher I. (2014) Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma. Pathology. 46, 411–415.

Baker S.J., Markowitz S., Fearon E.R., Willson J.K., Vogelstein B. (1990) Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type P53. Science. 249; 912-915.

Beatty G.L., Paterson Y. (2001) Regulation of tumor growth by IFN-gamma in cancer immunotherapy. Immunol Res. 24, 201–10. McKeown-Longo P.J., Higgins P.J. (2017) Toll-like receptors. Advances in Wound Care. 6, 10.

Ben-Baruch, A. (2006) Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. Semin Cancer Biol. 16, 38-52.

Benhar M., Stamler J.S. (2005) A central role for S-nitrosylation in apoptosis. Nat Cell Biol. 7; 645–646.

Benslimane-Ahmim Z., Heymann D., Dizier B., Lokajczyk A., Brion R., Laurendeau I., Bièche I., Smadja D.M., Galy-Fauroux I., Colliec-Jouault S., et al. (2011) Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. J. Thromb. Haemost. 9, 834–843.

Beristain A.G., Narala S.R., Di Grappa M.A., Khokha R. (2012) Homotypic RANK signaling differentially regulates proliferation, motility and cell survival in osteosarcoma and mammary epithelial cells. J. Cell Sci. 125, 943–955

Berry D.L.; Blumenstein B.A., Magyary D.L., et al. (1996) Local toxicity patterns associated with intravesical bacillus Calmette-Guerin: a Southwest Oncology Group study. Int J Urol. 3; 98–100.

Bhatia P., Sanders M.M., Hansen M.F. (2005) Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB is inversely correlated with metastatic phenotype in breast carcinoma. Clin. Cancer Res. 11, 162–165.

Birajdar S.S., Radika M., Paremala K., Sudhakara M., Soumya M., Gadivan M. (2014) Expression of Ki67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. J. Oral Maxillofac. Pathol. 18; 169-176.

Bohle A., Brandau S. (2003) Immune mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. J Urol. 170, 964-69.

Böhle A., Jocham D., Bock P.R. (2003) Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. J Urol. 169, 90-95.

Bouck N. (1996) P53 and angiogenesis. Biochim Biophys Acta. 1287; 63-66.

Boyce B.F, Xing L. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther. 9, 1.

Brahmer J.R, Tykodi S.S., Chow L.Q., Hwu W.J., Topalian S.L., Hwu P., et al. (2012) Safetyand activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. The New England journal of medicine. 366, 2455-2465.

Breuil V., Schmid-Antomarchi H., Schmid-Alliana A., Rezzonico R., Euller-Ziegler L., Rossi B. (2003) The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic for human monocytes. FASEB J. 17, 2163–2165. Butte M.J., Pena-Cruz V., Kim M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2008) Interaction of human PD-L1 and B7-1. Molecular immun. 45, 3567-3572.

Campbell D.J., Ziegler S.F. (2007) FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. Nature reviews Immunology. 7; 305-310.

Cathomas R., Rothermundt C., Bode B., Fuchs B., von Moos R., Schwitter M. (2015) RANK ligand blockade with denosumab in combination with sorafenib in chemorefractory osteosarcoma: a possible step forward? Oncol. 88; 257-260.

Chae Y.K., Pan A., Davis A.A., Raparia K., Mohindra N.A., Matsangou M., Giles F.J. (2016) Biomarkers for PD-1/PD-L1Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection? Clin Lung Cancer. 17, 350-361.

Chawla S., Henshaw R., Seeger L., Choy E., Blay J.Y., Ferrari S., Kroep J., Grimer R., Reichardt P., Rutkowski P., et al. (2013) Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. Lancet Oncol. 14, 901–908.

Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA (2006) Expression of RANK/ RANKL/ OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. Cancer. 107:289-298.

Chen L.M., Kuo C.H., Lai T.Y., Lin Y.M., Su C.C., Hsu H.H., Tsai F.J., Tsai C.H., Huang C.Y., Tang C.H. (2011) RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. J. Cell. Biochem. 112; 933-941.

Chen Y.B., Mu C.Y., Huang J.A. (2012) Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. Tumori. 98; 751-755.

Cheng M.L., Fong L. (2014) Effects of RANKL-targeted therapy in immunity and cancer. Front Oncol. 3; 329

Chiong E., Gaston K.E., Grossman H.B. (2008) Urinary markers in screening patients with hematuria. World J. Urol. 26; 25-30.

Chuang F.H., Hsue S.S., Wu C.W., Chen Y.K. (2009) Immunohistochemical expression of RANKL, RANK, and OPG in human oral squamous cell carcinoma. J. Oral Pathol. Med. 38; 753-738.

Cohan R.H., Caoili E.M., Cowan N.C., Weizer A.Z., Ellis J.H. (2009) MDCT urography: exploring a new paradigm for imaging of bladder cancer. American Journal of Roentgenology, 192; 1501-1508.

Cohen E.D., Mariol M.C., Wallace R.M., et al. (2002) DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during Drosophila ovarian morphogenesis. Developmental Cell. 2, 437-448.

Cook J., Hagemann T. (2013) Tumour-associated macrophages and cancer. Curr. Opin. Pharmacol. 13, 595–601.

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., Gajewsky T.F. (2015) Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment

Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. Cell Rep.; 11, 1018-1030.

Crallan R.A.; Georgopoulos N.T., Sothgate J. (2006) Experimental models of human bladder carcinogenesis. Carcinogenesis. 27, 374-381.

Cree I.A., Booton R., Cane P., Gosney J., Ibrahim M., Kerr K., Lal R., Lewanski C., Navani N., Nicholson A.G., Nicolson M., Summers Y. (2016) PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. Histopath. 69, 177-186. Erratum in: Histopathology. 2017;70(2):318.

Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N. (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science. 265; 1582-1584.

Dângelo, J.G., Fattini C.A. (2005) Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 2ªed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu.

David E., Blanchard F., Heymann M.F., De Pinieux G., Gouin F., Rédini F., Heymann D. (2011) The bone niche of chondrosarcoma: a sanctuary for drug resistance, tumour growth and also a source of new therapeutic targets sarcoma. Sarcoma. 2011, 932451.

DeWolf W.C. (1995) P53: an important key to understanding urologic cancer. AUA Update Series. 14; 258.

Dias Neto J.A., Martins A.C.P., Pastorello M.T., Suaid H.J., Tucci Júnior S., Cologna A.J. (2002) Expressão nuclear do P53 em carcinoma de células transicionais da bexiga. Acta cir bras. 17; 29-33.

Dias, Q.C., Nunes I.D., Garcia P.V., Fávaro W.J. (2016) 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. 42, 942-954.

Diggs L.P., Hsueh E.C. (2017) Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. Biomark Res. 5; 12.

DiPaola R.S., Lattime E.C. (2007) Bacillus Calmette-Guerin mechanism of action: role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy. J Urol. 178, 1840-841.

Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., et al. (2002) Tumorassociated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of imune evasion. Nat Med. 8, 793–800.

Droeser R.A., Hirt C., Viehl C.T., Frey D.M., Nebiker C., Huber X., et al. (2013) Clinical impact of programmed cell death ligand 1 expression in colorectal cancer. European journal of cancer. 49, 2233-2242.

Durán N, Dias QC, Fávaro WJ (2019) OncoTherad: A new nanobiological response modifier, its toxicological and anticancer activities. Journal of Phys: Conf. Ser. 1323.

Emens LA, Braiteh FS, Cassier P, Delord J-P., Eder JP, Fasso M, et al. (2015) Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. Ann. Meet. Amer. Ass. Cancer Res..2015, Abstr 2859.

Epstein J.I. (2003) The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? Crit Rev Oncol Hematol. 47; 83-89.

Epstein J.I., Amin M.B., Reuter V.R., et al. (1998) The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional) neoplasms of the urinary bladder. Am J Surg Pathol. 22,1435–1448.

Fávaro W., Durán N. (2017) Process of obtaining a nanostructured complex (CFI-1), associated to nanostructured CFI-1 with a protein (MRB-CFI-1) and its use. Brazil Patent No. PIBR 2017; 10.2017.012768.0.

Fávaro W.J., Durán N. (2020) A method for producing a nanostructured complex (cfi-1), a protein associated nanostructured complex (mrb-cfi-1) and use. US Patent App. 16/617,493.

Fávaro W.J., Iantas S.R., Gonçalves J.M., Dias Q.C., Reis I.B., Billis A., Durán N., Alonso J.C. (2019) 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.

Fávaro W.J., Nunes O.S., Seiva F.R., Nunes, I.S., Woolhiser L.K., Durán N., Lenaerts A.J. (2012) Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. Infect Agent Cancer. 7; 14.

Finlay C.A., Hinds P.W., Levine A.J. (1989) The P53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell. 57; 1083-1093.

Fiumara P., Snell V., Li Y., Mukhopadhyay A., Younes M., Gillenwater A.M., Cabanillas F., Aggarwal B.B., Younes A. (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. Blood. 98; 2784–2790.

Folkman J. (2006) Antiangiogenesis in cancer therapy–endostatin and its mechanisms of action. Exp Cell Res. 312; 594–607.

Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nature immunology. 4; 330-336.

Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., et al. (2009) PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med. 206, 3015-3029.

Frazier K.S., Seely J.C., Hard G.C., Betton G., Burnett R., Nakatsuji S., Nishikawa A., Durchfeld-Meyer B., Bube, A. (2012) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. Toxicologic pathology, 40(4\_suppl), 14S-86S.

Frega S., Maso A.D., Ferro A., Bonanno L., Conte D.F., Passelo G. (2019) Heterogeneous tumor features and treatment outcome between males and females with lung cancer (LC): do gender and sex matter? Crit. Rev. Oncol/ Hematol. 138; 87-103.

Fujimura T., Kambayashi Y., Furudate S., Asano M., Kakizaki A., Aiba S. (2015) Receptor activator of NF-[kappa]B ligand promotes the production of CCL17 from RANK+ M2 macrophages. J. Invest. Dermatol. 135; 2884–2887.

Galli R., Starace D., Busà R., Angelini D.F., Paone A., De Cesaris P., Filippini A., Sette C., Battistini L., Ziparo E., Riccioli A. (2010) TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. J Immunol. 184; 6658-69.

Gandini S., Massi D., Mandalà M. (2016) PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 100; 88-98.

Garcia P.V., Apolinário L.M., Böckelmann P.K., Nunes I.S., Durán N., Fávaro W.J. (2015) 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. 8, 4427-4443.

Garcia P.V., Apolinário L.M., Böckelmann P.K., Nunes I.S., Durán N., Fávaro W.J. (2015) 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. 8, 4427-4443.

Garcia, P.V., Seiva F.R.F., Carniato A.P., De Mello Junior W., Durán N., Macedo A.M., De Oliveira A.G.; Romih R., Nunes I.S., Nunes O.S., Fávaro W.J (2016) Increased tolllike receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. BMC Cancer. 16; 422.

García-Rodríguez J., Fernández Gómez J.Á., Escaf Barmadah S., González Álvarez R.C., Rodríguez Robles L., Miranda Aranzubia O. (2006) Factores pronósticos en la recidiva y progresión del cáncer superficial vesical: Gurpos de riesgo (Parte I). Actas Urol Esp.30; 998-1008.

Gartrell B., Saad F. (2014) Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. Nat Rev Clin Oncol. 11, 335–45.

Gatalica Z., Snyder C., Maney T., Ghazalpour A., Holterman D.A., Xiao N., et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. Cancer Epidemiol Prev Biomarkers. 23, 12.

Gewirtz, A.T., Simon P.O.Jr., Schmitt C.K., Taylor L.J., Hagedorn C.H., O'Brien A.D., Neish A.S., Madara J. L. (2001). Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. J. Clin. Investig. 107, 99-109.

Ghebeh H., Mohammed S., Al-Omair A., Qattan A., Lehe C., Al-Qudaihi G., et al. (2006) The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with importante high-risk prognostic factors. Neoplasia. 8; 190-198.

Golden D., Saria E.A., Hansen M.F. (2015) Regulation of osteoblast migration involving receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) signaling. J. Cell Physiol. 230, 2951–2960.

Gottlieb T.M., Oren M. (1996) P53 in growth control and neoplasia. Biochim Biophys Acta. 1287; 77-102.

Groot A.F., Appelman-Dijkstra N.M., Van der Burg S.H., Kroep J.R (2018) The antitumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors–a systematic review. Cancer Treat. Rev, 62; 18-28.

Guidos C.J., Williams C.J., Grandal I., Knowles G., Huang M.T., Danska J.S. (1996) V(D)J recombination activates a P53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. Genes Dev. 10; 2038-2054.

Gurbuz R., Salvarci A. (2020) Follow-up criteria and cystoscopic classifications of bladder lesions: A retrospective analysis. Annals of Med. Res. 27; 1498-1506.

Habuchi T., Marberger M., Droller M.J., Hemstreet G.P., Grossman H.B., Schalken J.A., et al. (2005) Prognostic markers for bladder cancer: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urology. 66; 64–74.

Hall, M.C., Chang S.S., Dalbagni G., Pruthi R.S., Seigne J.D., Skinner E.C., WolfJ.S. JR, Schellhammer P.F. (2007) Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder câncer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. J Urol. 178; 2314-2330.

Hamanishi J, Murakami R, Baba T, Yamaguchi K, Abiko K, Mandai M (2019) Passenger fusion genes are correlated to antitumor effect of anti-PD-1 antibody nivolumab for ovarian cancer. Gynecol Oncol., 154; 86.

Hamanishi J., Mandai M., Iwasaki M., Okazaki T., Tanaka Y., Yamaguchi K., et al. (2007) Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104, 3360-3365.

Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. (2011) RANKL/RANK beyond bones. J Mol Med (Berl). 89; 647–56.

Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E. (2005) Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. J Immunol. 174, 2942–950.

Hayat M.J., Howlader N., Reichman M.E, Edwards B.K. (2007) Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) Program. Oncologist. 12, 20-37.

Herbst R.S., Soria J.C., Kowanetz M., Fine G.D., Hamid O., Gordon M.S., et al. (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 515; 563-567.

Heymann M.F., Riet A., Le Goff B., Battaglia S., Paineau J., Heymann D. (2008) OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. Regul. Pept. 148; 46–53.

Hicks R.M., Wakefield J.S. (1972) Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. Chem Biol Interact. 5, 139–152.

Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B, et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. The New England journal of medicine. 363; 711-723.

Hofbauer L.C., Heufelder A.E. (2001) Role of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med. 79; 243–253.

Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Sørlie T., et all (1994). Database of P53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res. 22; 3551-3555.

Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 299; 1057-1061.

Hu H., Wang J., Gupta A., Shidfar A., Branstetter D., Lee O., Ivancic D., Sullivan M., Chatterton R.T., Jr, Dougall W.C., Khan S.A. (2-14) RANKL expression in normal and

malignant breast tissue responds to progesterone and is up-regulated during the luteal phase. Breast Cancer Res. Treat. 146; 515–523.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer de bexiga. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga. Acesso em 21/08/2020.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (UICC). (2009) TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed. Sobin, LH.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C.H.; eds. New York: Wiley.

Iria M. (2021) RANK signaling in the differentiation and regeneration of thymic epithelial cells. Front. Immunol. 11; 623265.

Jahrreiss V., Pradere B., Laukhtina E., Mori K., Shariat S.F. (2020) Catalog of exogenous risk factors for bladder carcinogenesis. Curr Opin Urol. 30; 449-456.

Jones V.S., Huang R.Y., Chen L.P., Chen Z.S., Fu L., Huang R.P. (2016) Cytokines in cancer drug resistance: cues to new therapeutic strategies. Biochim. Biophys. Acta. 1865; 255–265.

Kamat A.M., Colombel M., Sundi D., Lamm D., Boehle A., Brausi M., et al. (2017) BCGunresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: recommendations from the IBCG. Nat. Rev. Urol. 4, 244-55.

Kambayashi Y., Fujimura T., Furudate S., Asano M., Kakizaki A., Aiba S. (2015) The possible interaction between receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand expressed by extramammary paget cells and its ligand on dermal macrophages. J. Invest. Dermatol. 135; 2547–2550.

Kelsh R., You R., Horzempa C., Zheng M., McKeown-Longo P.J. (2014) Regulation of the innate immune response by fibronectin: synergism between the III-1 and EDA domains. PlosOne. 9; 7.

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. (2005) Neutrophil stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. Blood. 106; 3474-3482.

Kerr K.M., Nicolson M.C. (2016) Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. Arch Pathol Lab Med. 140; 249-254.

Khattri R., Cox T., Yasayko S.A., Ramsdell F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nature immunology. 4; 337-342.

Killeen S.D., Wang J.H., Andrews E.J., Redmond H.P. (1996) Exploitation of the Toll like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? Br J Cancer. 95, 247–52.

Kim H.H., Shin H.S., Kwak H.J., Ahn K.Y., Kim J.H., Lee H.J., Lee M.S., Lee Z.H., Koh G.Y. (2003) RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. FASEB J. 17, 2163–2165.

Kim Y.M., Kim Y.M., Lee Y.M., Kim H.S., Kim J.D., Choi Y., Kim K.W., Lee S.Y., Kwon Y.G. (2002) TNFrelated activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells. J. Biol. Chem. 277, 6799–6805.

Komita H., Homma S., Saotome H., Zeniya M., Ohno T., Toda G. (2006) Interferongamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating CD8+T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 662-672.

Kong Y.Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H.L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A.J., Van G., Itie A., et al. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature. 397, 315–323.

Kresowik T.P., Griffith T.S. (2009) Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. Immunotherapy. 1, 281-288.

Kulkarni, G.S. (2020). Nadofaragene firadenovec: a new gold standard for BCGunresponsive bladder cancer? Lancet Oncol. 2045; 3056.

Kumar H., Kawai T., Akira S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. Int Ver Immunol. 30; 16-34.

Lamm D., Persad R., Brausi M., Buckley R., Witjes J.A., Palou J., Böhle A., Kamat A.M., Colombel M., Soloway M. (2014) Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition. J Urol 2014; 191:20–27.

Lee J.A., Jung J.S., Kim D.H., Lim J.S., Kim M.S., Kong C.B., Song W.S., Cho W.H., Jeon D.G., Lee S.Y., Koh J.S. (2011) RANKL expression is related to treatment outcome of patients with localized, high-grade osteosarcoma. Pediatr. Blood Cancer. 56, 738–743.

Lee R.J., Saylor P.J, Smith M.R. (2011) Treatment and prevention of bone complications from prostate cancer. Bone. 48,88–95.

Levine A.J. (1997) P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 88;323-331.

Li X., Liu Y., Wu B., Dong Z, Wang Y, Lu J, et al. (2014) Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. Oncol. Rep. 32; 2605–2611.

Li X., Liu Y., Wu B., Dong Z., Wang Y., Lu J., Shi P., Bai W., Wang Z. (2014) Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. Oncol. Rep. 32, 2605–2611.

Li Z., Dong P., Ren M., Song Y., Qiang X., Yang Y., Li S., Zhang X., Liu F. (2016) PD-11 expression is associated with tumor FOXP3+ regulatory T-Cell infiltration of Breasy Cancer and poor prognosis of patient. Journ. Of Cancer. 7; 784-793.

Li, Z., Pradera F., Kammertoens T., Li B., Liu S., Qin Z. (2007) Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection. J. Immunol. 179, 1568–1576.

Lightfoot A.J., Rosevear H.M., O'Donnell M.A. (2011) Recognition and treatment of BCG failure in bladder cancer. Sci World J. 11, 602–613.

Lim L.Y., Vidnovic N., Ellisen L.W., Leong C.O. (2009) Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. Br J Cancer. 101; 1606–1612.

Linke S.P., Clarkin K.C., DiLeonardo A., Tsou A., Wahl G.M. (1996) A reversible, P53dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. Genes Dev. 10; 934-947. Linzer D.I., Levine A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell. 17; 43-52.

Liu F., Lang R., Zhao J., Zhang X., Pringle G.A., Fan Y., et al. (2011) CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast câncer survival and molecular subtypes. Breast cancer research and treatment. 130; 645-655.

Liu F., Li Y., Ren M., Zhang X., Guo X., Lang R., et al. (2012) Peritumoral FOXP3(+) regulatory T cell is sensitive to chemotherapy while intratumoral FOXP3(+) regulatory T cell is prognostic predictor of breast cancer patients. Breast cancer research and treatment. 135; 459-467.

Liu Y., Wang J., Ni T., Wang L., Wang Y., Sun X. (2016) CCL20 mediates RANK/RANKL-induced epithelial–mesenchymal transition in endometrial cancer cells. Oncotarget. 7:25328-25339.

Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T. (1993) P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature. 362; 847-849.

Luo J.L., Maeda S., Hsu L.C., Yagita H., Karin M. (2004) Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. Cancer Cell. 6; 297–305.

Maheswaran S., Englert C., Bennett P., Heinrich G., Haber D.A. (1995) The WT1 gene product stabilizes P53 and inhibits P53-mediated apoptosis. Genes Dev. 9; 2143-2156.

Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. (2008) Cancer-related inflammation. Nature, 454, 436–444.

Martini M., Testi M.G., Pasetto M., Picchio M.C., Innamorati G., Mazzocco M. (2010) IFN-Gamma-Mediated Upmodulation of MHC Class I Expression Activates Tumor-Specific Immune Response in a Mouse Model of Prostate Cancer. Vaccine. 28; 3548-3557.

Menendez D., Shatz M., Azzam K. (2011) The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. Plos Genet. 3; 1-15.

Mhawech-Fauceglia P., Cheney R.T., Schwaller J. (2006) Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review.

Mikami S., Katsube K., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mochizuki S., Ikeda T., Mukai M., Okada Y. (2009) Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas. J. Pathol. 218; 530-539.

Min J.K., Cho Y.L., Choi J.H., Kim Y., Kim J.H., Yu Y.S., Rho J., Mochizuki N., Kim Y.M., Oh G.T., Kwon Y.G. (2007) Receptor activator of nuclear factor-kB ligand increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. Blood. 109, 1496-1502.

Min J.K., Kim Y.M., Kim Y.M., Kim E.C., Gho Y.S., Kang I.J., Lee S.Y., Kong Y.Y., Kwon Y.G. (2003) Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF-kappa B (RANK) in endothelial cells: concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. J. Biol. Chem. 278; 39548–39557

Ming J., Cronin S.J.F., Penninger J.M. (2020) Targeting the RANKL/RANK/OPG axis for cancer therapy. Front. Oncol. 10; 1283.

Morales A., Eidinger D., Bruce A.W. (1976) Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. J Urol. 115, 377-380.

Mori K., Le Goff B., Berreur M., Riet A., Moreau A., Blanchard F., Chevalier C., Guisle-Marsollier I., Léger J., Guicheux J., et al. (2007) Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. J. Pathol. 11; 555–562.

Mori K., Le Goff B., Charrier C., Battaglia S., Heymann D., Rédini F. (2006) DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFkappaB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. Bone. 40; 981–890.

Mueller C.G., Hess E. (2012) Emerging functions of RANKL in lymphoid tissues. Front. Immunol. 3; 261.

Muenst S., Schaerli A.R., Gao F., Daster S., Trella E., Droeser R.A., et al. (2014) Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. Breast cancer research and treatment. 146, 15-24.

Mugabe C., Matsui Y., So A.I., Glave M.E. et al. (2011) *In vivo* evaluation of mucoadhesive nanoparticulate Docetaxel for intravesical treatment of Non-Muscle-Invasive bladder cancer. Clin Cancer Res. 9, 2788-2798.

Nezos A., Pissimisis N., Lembessis P., Sourla A., Dimopoulos P., Dimopoulos T., Txelepis K., Koutsilieris M. (2009) Detection Of Circulating Tumor Cells In Bladder Cancer Patients. Cancer Treat Ver. 35, 272-279.

Ni X.Y., Sui H.X., Liu Y., Ke S.Z., Wang Y.N., Gao F.G. (2012) TGF-beta of lung câncer microenvironment upregulates B7H1 and GITRL expression in dendritic cells and is associated with regulatory T cell generation. Oncology reports. 28; 615-621.

Nicolau C., Bunesch L., Sebastia C., Salvador R. (2010) Diagnosis of bladder cancer: contrast-enhanced ultrasound. Abdom. Imag. 35; 494-503.

Nunes I.S.; Durán N. Imunomodulador agregado proteico de anidrido de fosfolinoleatopalmitoleato de amônia e magnésio e processo de sua obtenção e formulação. Nº Patente: PI0305373-3. Deposito no INPI: 06/11/2003.

O'Donnel M.A.; Bole A. (2006) Treatment options for BCG failures. World J Urol.; v.24, p.481–487, 2006.

Odero-Marah V.A., Wang R., Chu G., Zayzafoon M., Xu J., Shi C., Marshall F.F., Zhau H.E., Chung L.W. (2008) Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cell Res. 18, 858-870.

Ojea A., Nogueira J.L., Solsona E., et al. (2007) A multicentre, randomised prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: low-dose bacillus Calmette-Guerin (27 mg) versus very low-dose bacillus Calmette-Guerin (13.5 mg) versus mitomycin C. Eur Urol. 52; 1398–1406.

Oliveira, P.A. Colaco, A.; De La Cruz, P.L.F. (2006) Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. Exp Oncol. 28; 2-11.

Palafox M., Ferrer I., Pellegrini P., Vila S., Hernandez-Ortega S., Urruticoechea A., Climent F., Soler M.T., Muñoz P., Viñals F., et al. (2012) RANK induces epithelialmesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. Cancer Res. 72; 2879–2888. Pan Y., Lavelle J.P., Bastacky S.I., Meyers S., Pirtskhalaishvili G., Zeidel M.L., Farkas D.L. (2001) Detection of tumorigenesis in rat bladders with optical coherence tomography. Medical Physics. 28; 2432-2440.

Pang K.H., Catto J.W.F. (2013) Bladder Cancer. Renal and Urological Surgery II, Elsevier. 523-529.

Paone A., Starace D., Galli R., Padula F., De Cesaris P., Filippini A., Ziparo E., Riccioli A. (2008) Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- $\alpha$ – dependent mechanism. Carcinogenesis. 29;1334-1342.

Papanastasiou A.D., Sirinian C., Kalofonos H.P. (2012) Identification of novel human receptor activator of nuclear factor-kB isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. Breast Cancer Res. 14; 112.

Pardoll D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 12; 252–264.

Park H.S., Lee A., Chae B.J., Bae J.S., Song B.J., Jung S.S. (2014) Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as a poor prognostic marker in breast cancer. J. Surg. Oncol. 110; 807–812.

Patel S.P., Kurzrock R. (2015) PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. Mol Cancer Ther. 14.

Perabo F.G., Willert P.L., Wirger A., Schmidt D.H., Von Ruecker A., Mueller S.C. (2005) Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. Anticancer Res. 25, 3565-3573.

Perabo F.G., Willert P.L., Wirger A., Schmidt D.H., Von Ruecker A., Mueller S.C. (2005) Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. Anticancer Res. 25, 3565-3573.

Pfitzner B.M., Branstetter D., Loibl S., Denkert C., Lederer B., Schmitt W.D., Dombrowski F., Werner M., Rüdiger T., Dougall W.C., von Minckwitz G. (2014) RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 145; 307-315.

Piccinini A.M., Zuliani-Alvarez L., Lim J.M.P., Midwood K.S. (2016) Distinct microenvironmental cues stimulate divergent TLR4-mediated signaling pathways in macrophages. Science Sign. 9; 86.

Pook S.H., Esuvaranathan K., Mahendran R. (2002) N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized Mycobacterium bovis in human bladder cancer cells. J Urol. 168; 780-785.

Poon S.L., Huang M.N., Choo Y., McPherson J.R., Yu W., Heng H.L; Gan A., Myint S.S., Siew E.Y., Ler L.D., Ng L.G., Weng W.H., Chuang C.K., Yuen J.S., Pang S.T., Tan P., Teh B.T., Rozen S.G. (2015) Mutation Signatures Implicate Aristolochic Acid In Bladder Cancer Development. Genome Med. 7; 1-10.

Powles T., Eder J.P., Fine G.D., Braiteh F.S., Loriot Y., Cruz C., et al. (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. Nature. 515; 558-562.

Qian L.W., Fourcaudot A.B., Yamane K., You T., Chan R.K., Leung K.P. (2016) Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. Wound Repair Regen. 24; 26-34.

Quiao H, Cui Z, Yang S, Ju D, Wang Y, Yang Y, Han X, Fan Q, Qin A, Wang T, He XP., Bu W, Tang T (2017) Targeting osteocytes to attenuate early breast cancer bone metastasis by theranostic upconversion nanoparticles with responsive plumbagin release. ACS Nano. 7:7259–7273.

Quintero A., Alvarez-Kindelan J., Luque R.J., Gonzalez-Campora R., Requena M.J., Montironi R., et al. (2006) Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary TaT1 urothelial cell carcinoma of the bladder. J Clin Pathol. 59; 83-88.

Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. (2009) Toll-like receptors and cancer. Nat Rev Cancer. 9, 57-63.

Rebelatto M.C., Midha A., Mistry A., et al. (2016) Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. Diagn Pathol. 11; 95.

Reis L.O., Ferreira U., Billis A., Cagnon V.H., Fávaro W.J. (2012) Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. J Urol. 2; 438-45.

Reis, L.O., Fávaro W.J., Ferreira U., Billis A., Fazuoli M.G., Cagnon V.H. (2010) Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. World J Urol. 4, 499-505.

Reis, L.O., Pereira T.C., Fávaro W.J., Cagnon V.H., Lopes-Cendes I., Ferreira U. (2009) Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. World J Urol. 27, 353-361.

Renema N, Navet B, Heymann MF, Lezot F, Heymann D (2016) RANK-RANKL signalling in cancer. Biosci. Rep. 36:1-18.

Ro J.Y., Starkel G.A., Ayala A.G. (1992) Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am. 19, 435-53.

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. (2015). Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. N. Engl. J. Med. 372:30-39.

Rodríguez-Alonso A., Pita-Fernández S., Gonzalez-Carreró J., Nogueira-March J.L. (2002) Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. Cancer. 94; 1677-1684.

Rosenquist T. A., Grollman A. P. (2016) Mutational signature of aristolochic acid: Clue to the recognition of a global disease. DNA Repair. 44, 205-211.

Roux S., Amazit L., Meduri G., Guiochon-Mantel A., Milgrom E., Mariette X. (2002) RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone. Am. J. Clin. Pathol. 117, 210–216.

Saleh R, Elkord E (2020) FoxP3bT regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets. Cancer Lett. 490:174-185.

San Miguel Fraile P.; Antón Badiola I., Ortiz Rey J.A., Álvarez Álvarez C, Fernández Costas A., Lago Fernández M., et al. (2003) Estudio comparativo de la expresión de p53, Ki67, bcl-2 y CK20 en el carcinoma transicional superficial de vejiga: correlación con la recurrencia, grado histológico y estadio clínico. Actas Urol Esp. 27; 587-593.

Sander B., Damm O., Gustafsson B. (1996) Localization of IL-1, IL-2, IL-4, IL-8 and TNF in superficial bladder tumors treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. J Urol. 156; 536-541.

Santini D., Perrone G., Roato I., Godio L., Pantano F., Grasso D., Russo A., Vincenzi B., Fratto M.E., Sabbatini R., et al. (2011a) Expression pattern of receptor activator of NFkB (RANK) in a series of primary solid tumors and related metastases. J. Cell Physiol. 226; 780–784.

Santini D., Schiavon G., Vincenzi B., Gaeta L., Pantano F., Russo A., Ortega C., Porta C., Galluzzo S., Armento G., et al. (2011b) Receptor activator of NF-kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. PLoS One. 6; 19234.

Satoh T., Akira S. (2016) Toll-Like Receptor Signaling And Its Inducible Proteins. Microbiol Spectr. 2016.

Schalper K.A., Velcheti V., Carvajal D., Wimberly H., Brown J., Pusztai L., et al. (2014) In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. Clinical cancer research: an oficial journal of the American Association for Cancer Research. 20; 2773-2782.

Schamhart D.H., Boer E.C., Reije T.M. (2000) Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. Eur Urol. 37, 16.

Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, Kenner L, Pospisilik JA, Lee HJ, et al. (2010) Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestindriven mammary cancer. Nature. 468; 98–102.

Schreiber T.H. (2007) The use of FoxP3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 16; 1931-1934.

Shankaran V., Iked H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J., et al. (2001) IFNgamma and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. Nature. 410; 1107–1111.

Sharpe A.H., Wherry E.J., Ahmed R., et al. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat Immunol. 8; 239-245.

Shin M., Matsuo K., Tada T., Fukushima H., Furuta H., Ozeki S., Kadowaki T., Yamamoto K., Okamoto M., Jimi E. (2011) The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. Carcinogenesis. 32 1634–1640.

Shirota, Y., Shirota H., Klinman D.M. (2012) Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. J. Immunol. 188 1592-1599.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (1983) Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 62; 10-29, 2012.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2019. (2019) CA Cancer J Clin. 69; 7-34.

Simatou A, Sarantis P, Koustas E, Papavassiliou AG, Karamouzis MV (2020) The Role of the RANKL/RANK Axis in the Prevention and Treatment of Breast Cancer with Immune Checkpoint Inhibitors and Anti-RANKL. Int. J. Mol. Sci. 21; 7570.

Sisay M, Mengistu G, Edessa D (2017) The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: potential targets for anticancer therapy. Onco Targets Ther. 10:3801-3810.

Smith N.D., Rubenstein J.N., Eggener S.E., Kozlowski J.M. (2003) The P53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. J Urol. 169; 1219-1228.

Sobacchi C, Menale C, Villa A (2020) The RANKL-RANK axis: a bone to thymus round trip. Front. Immunol. 10:629-638.

Soloway M.S., Nissenkorn I., McCallum L. (1983) Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: comparison of cauterization with N-methyl-N-nitrosourea. Urology. 21, 159-161.

Song F.N., Duan M., Liu L.Z., Wang Z.C., Shi J.Y., Yang L.X., Zhou J., Fan J., Gao Q., Wang X.Y. (2014) RANKL promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via NF-κB-mediated epithelial–mesenchymal transition. PLoS One. 9, 108.

Sottnik J.L., Keller E.T. (2013) Understanding and targeting osteoclastic activity in prostate cancer bone metastases. Curr Mol Med. 13, 626–39.

Steinberg G.D., Brendler C.B., Ichikawa T. (1990) Characterization of an N-methyl-Nnitrosourea induced autochthonous rat bladder cancer model. Cancer Res. 50, 6668– 6741.

Steinberg G.D., Smith N.D, Ryder K., Stragman N.M., Slater S.J. (2011) Factors affecting valrubicin response in patients with bacillus Calmette-Guérin-refractory bladder carcinoma in situ. Postgrad Med. 123; 28–34.

Stopglia R.M., Matheus W.E., Garcia P.V., Billis A., Castilho M.A., Figueiredo de Jesus V.H., Ferreira U., Fávaro W.J. (2015) Molecular Assessment of Non-Muscle Invasive and Muscle Invasive Bladder Tumors: Mapping of Putative Urothelial Stem Cells and Toll-Like Receptors (TLR) Signaling. J Cancer Therapy. 6; 129-140.

Sun Y., Wang Y., Zhao J, et al. (2006) B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 53, 143–151.

Swann JB, Smyth MJ (2007) Immune surveillance of tumors. J. Clin. Invest. 117:1137-1146.

Takeda K., Akira S. (2004) TLR signaling pathways. Semin Immunol. 16; 3-9.

Tate J.R., D.J., Patterson J.R., Velasco-Gonzalez C., Carroll E.N., Trinh J., Edwards D., et al. (2012) Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. Int J Biol Sci. 8; 1109-1120.

Taube J.M., Galon J., Sholl L.M., Rodig S.J., Cottrell T.R., Giraldo N.A., et al. (2018) Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. Mod. Pathol. 31; 214-234.

Taube J.M., Klein A., Brahmer J.R., Xu H., Pan X., Kim J.H., et al. (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin. Cancer Res. 20; 5064-5074.

Teodoro J.G., Parker A.E., Zhu X., Green M.R. (2006) p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. Science. 313; 968-971.

Theoleyre S., Wittrant Y., KwanTat S., Fortun Y., Redini F., Heymann D. (2004) The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev. 15; 457–475.

Trieb K., Windhager R. (2015) Receptor activator of nuclear factor κB expression is a prognostic factor in human osteosarcoma. Oncol. Lett. 10; 1813–1815.

Tyner S.D, Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., et all (2002) P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature. 415; 45-53.

Van Poznak C., Cross S.S., Saggese M., Hudis C., Panageas K.S., Norton L., Coleman R.E., Holen I. (2006) Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. J. Clin. Pathol. 59; 56–63.

Van Rhijn B.W., Zuiverloon T.C., Vis A.N., Radvanyi F., van Leenders G.J., Ooms B.C., et al. (2010) Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. Eur Urol. 58: 433–441.

Wan L., Pantel K., Kang Y. (2013) Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. Nat. Med. 19; 1450–1464.

Wang J., Sun X., Zhang H., Wang Y., Li Y. (2015) MPA influences tumor cell proliferation, migration, and invasion induced by RANKL through PRB involving the MAPK pathway in endometrial cancer. Oncol. Rep. 33, 799–809.

Wang X., Teng F., Kong L., Yu J. (2016) PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. Onco Targets Ther. 9; 5023-5039.

Wang X.W., Hussain S.P., Huo T.I., Wu C.G., Forgues M., Hofseth L.J., et al. (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Toxicology. 181; 43-47.

Weldon T.E., Soloway M.S. (1975) Susceptibility of urothelium to neoplastic cellular implantation. Urol. 5, 824-827.

Wittrant Y., Théoleyre S., Chipoy C., Padrines M., Blanchard F., Heymann D., Rédini F. (2004) RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. Biochim. Biophys. Acta. 1704; 49–57.

Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y. (1997) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a New TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell specific survival factor. J. Exp. Med. 186, 2075–2080.

Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Vologodskaia M., Steinman R.M., Choi Y. (1998) The TRAF family of signal transducers mediates NF-kB activation by the TRANCE receptor. J Biol Chem. 273, 28355–28359.

Woo S.R., Fuertes M.B., Corrales, L., Sprangers S., Furdyna M.J., Leung M.Y., Duggan R., Wang Y., Barber G.N., Fitzgerald K.A., Alegre M.L., Gajewski T.F. (2014) STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. Immunity. 41, 830-842.

Wu X., Li F., Dang L., Liang C., Lu A., Zhang G. (2020) RANKL/RANK system-based mechanism for breast cancer bone metastasis and related therapeutic strategies. Front. Cell Dev. Biol. 8; 76

Xie S., Lu Y., Quiao X., Hua R.X., Wang K., Shan X.F., Cai Z.G. (2016) What is the prognostic significance of Ki67 positivity in oral squamous cell carcinoma? J. Cancer, 7; 758-767.

Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., et al. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. International immunology. 16; 1643-1656.

Yamada T., Tsuda M., Takahashi T., Totsuka Y., Shindoh M., Ohba Y. (2011) RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. Am. J. Pathol. 178, 2845–2856.

Yamaguchi K., Sugano K., Fukayama, et al. (1997) Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. Am J Gastroenterol. 92; 307-312.

Yeung C., Dinh T., Lee J. (2014) The health economics of Bladder Cancer: an updated review of the published literature. Pharmacoeconomics. 32, 1093-104.

Yin H., Leong A.S. (2004) Histologic grading of noninvasive papillary urothelial tumors: validation of the 1998 WHO/ISUP system by immunophenotyping and follow-up. Am J Clin Pathol. 121; 679-687.

Yu D.S., Lee C.F., Chang S.Y. (2007) Immunotherapy for orthotopic murine bladder cancer using bacillus Calmette-Guerin recombinant protein Mpt-64. J Urol. 177; 738–742.

Yu H., Boyle T.A., Zhou C., Rimm D.L., Hirsch F.R. (2016) PD-L1 expression in lung cancer. J. Thorac. Oncol. 11; 964–975.

Zeegers M.P., Tan F.E., Dorant E. (2000) The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. Cancer. 89, 630–639.

Zeini M., Través P.G., López-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M. (2006) Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. J Immunol. 177; 3327-3336.

Zeuke, S., Ulmer A., Kusumoto S., Katus H.A. (2002) TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. Cardiovasc. Resear. 56, 126-34.

Zhang L., Teng Y., Zhang Y., Liu J., Xu L., Qu J., Hou K., Yang X., Liu Y., Qu X. (2012) Receptor activator for nuclear factor κB expression predicts poor prognosis in breast cancer patients with bone metastasis but not in patients with visceral metastasis. J. Clin. Pathol. 65, 36–40.

Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Bruggen N.V., Chopp M. (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. J Clin Invest. 106; 829-838.

Zhao B, Chang L, Fu H, Sun G, Yang W (2018) The role of autoimmune regulator (AIRE) in peripheral tolerance. J. Immunol. Res. 2018: 1-6.

Zhao S., Zhang Y., Zhang Q., Wang F., Zhang D. (2014) Toll-like receptors and prostate cancer. Front Immunol. 5; 352.

Zou W., Chen L. (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. Nat Rev Immunol. 8, 467–477.
## ANEXO 1 – Certificado de Bioética e Biossegurança





## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada <u>Efeitos do Modificador de Resposta Biológica – Complexo</u> <u>Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1) na Via de Sinalização dos Receptores Toll-like e p53: Nova</u> <u>Perspectiva Terapêutica para o Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo</u>, registrada com o nº <u>4579-1/2017</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Wagner José Fávaro e lanny Brum Reis</u>, 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 reunião de <u>11 de maio de</u> <u>2017</u>.

Finalidade:	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	06/06/2017-31/05/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	06/06/2017-31/05/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	50
Peso / Idade:	07 semanas / 40g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

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

Campinas, 11 de maio de 2017.

WT

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

<u>IMPORTANTE</u>: 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 2 – Declaração de Direitos Autorais

## 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 "NOVA PERSPECTIVA TERAPÊUTICA PARA O CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: O MODIFICADOR DE RESPOSTA BIOLÓGICA – COMPLEXO FOSFATO INORGÂNICO 1 (MRB-CFI-1) ", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de gualquer editora.

Campinas, 21de janeiro de 2021.

Assinatura :

Nome do(a) autor(a): lanny Brum Reis RG n.° 13577384

Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): Wagner José Fávaro RG n.° 33.478.777-4 Prof° Dr. Wagner J. Fávaro IB/UNICAMP - Matr 300898 Membro ASCO - 7103829 Membro ESMO - 506089