



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARINA VIAN OSSICK

CARCINOGENESE E TRATAMENTO INTRAVESICAL COM BACILO CALMETTE-
GUERIN (BCG) DO CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO SOB
SUPLEMENTAÇÃO DE TRIPTOFANO E TIMINA

CAMPINAS

2021

MARINA VIAN OSSICK

CARCINOGENESE E TRATAMENTO INTRAVESICAL COM BACILO CALMETTE-
GUERIN (BCG) DO CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO SOB
SUPLEMENTAÇÃO DE TRIPTOFANO E TIMINA

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

ORIENTADOR: LEONARDO OLIVEIRA REIS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA MARINA VIAN OSSICK E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

Ossick, Marina Vian, 1992-
Os71c Carcinogênese e tratamento intravesical com bacilo *calmette-guérin* (BCG) do câncer de bexiga não-músculo invasivo sob suplementação de triptofano e timina / Marina Vian Ossick. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. BCG. 2. Neoplasias da bexiga. 3. Suplementação. I. Reis, Leonardo Oliveira, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Carcinogenesis and bacillus calmette-guérin (BCG) intravesical treatment of non-muscle invasive bladder cancer under tryptophan and thymine supplementation

Palavras-chave em inglês:

BCG

Bladder neoplasms

Supplementation

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Leonardo Oliveira Reis [Orientador]

Mario José Abdalla Saad

Ubirajara Ferreira

Daher Cesar Chade

Rodolfo Borges dos Reis

Data de defesa: 16-06-2021

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4845-9403>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2808953514653423>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARINA VIAN OSSICK

ORIENTADOR: LEONARDO OLIVEIRA REIS

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

2. PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

3. PROF. DR. UBIRAJARA FERREIRA

4. PROF. DR. DAHER CESAR CHADE

5. PROF. DR. RODOLFO BORGES DOS REIS

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

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

Data de Defesa: 16/06/2021

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de vida, assim como a Universidade Estadual de Campinas por disponibilizar o espaço físico e a propriedade intelectual para desenvolver meu trabalho. Ao meu orientador professor Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis por proporcionar crescimento profissional e pessoal, bem como o grupo de pesquisa Urocience. Agradeço ao Laboratório LICRI do Prof Dr. Mário Saad e todos os seus colaboradores por fornecer espaço físico e pelo crescimento pessoal. Agradeço a duas pessoas muito especiais que fizeram parte desse período e me ensinaram muito, Heloisa Assalin e Willian Silva. Sou muito grata cada por cada conselho que me deram. Agradeço por cada erro que cometi, pois sem eles não teria aprendido. E por fim e não menos importante, agradeço a minha família e amigos por estarem ao meu lado em todos os momentos dessa trajetória. Obrigado a todos, sem vocês eu não conseguiria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, número do processo 88882.329868/2019-01.

RESUMO

O uso do Bacilo Calmette-Guérin (BCG) para o tratamento do câncer de bexiga (CB), embora associado a efeitos colaterais, mostra resposta significativa na diminuição da recidiva e progressão tumoral. Outros coadjuvantes na imunoterapia no câncer são os suplementos nutricionais, e novos compostos como triptofano e bases nitrogenadas estão sendo estudados para melhores prognósticos em pacientes oncológicos. Objetivo: Avaliar o impacto do triptofano e da timina (TT) na carcinogênese e no tratamento do câncer de bexiga com BCG intravesical. Métodos: Após a identificação do efeito inibitório do TT in vitro em múltiplas culturas de células cancerosas, o modelo animal de câncer de bexiga foi induzido por instilações intravesicais de MNU e randomizado em quatro grupos: Controle (n = 9), BCG (n = 9), TT (n = 7) e BCG + TT (n = 8). Os grupos BCG receberam 10^6 UFC de BCG intravesical em 0,2 ml de solução salina por 6 semanas consecutivas e os grupos TT receberam 1 g / kg (6:4) de TT via gavagem diária. Ao final do protocolo, os animais foram sacrificados e as bexigas urinárias submetidas a histopatologia, imunohistoquímica e Western blotting. Resultados: O câncer urotelial foi identificado em 100%, 85,7%, 44,5% e 37,5% dos grupos Controle, TT, BCG e BCG + TT, respectivamente. A proliferação celular marcada pelo Ki-67 nuclear foi maior no Controle em comparação aos animais dos demais grupos ($P = 0,03$). Os grupos BCG, TT e BCG + TT apresentaram declínio proliferativo de células e aumento da marcação de TLR4 / 5 no urotélio. O BCG diminuiu a marcação urotelial do VEGF, mesmo em associação com T. Conclusão: O TT inibe a carcinogênese urotelial e potencializa o BCG intravesical no tratamento do câncer de bexiga por meio da redução da proliferação celular e ativação de TLRs.

Palavras-chave: BCG; neoplasia de bexiga; suplementação.

ABSTRACT

The use of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) for the treatment of bladder cancer (CB), although associated with side effects, shows a significant response in decreasing recurrence and tumor progression. Other adjuncts in cancer immunotherapy are nutritional supplements, and new compounds such as tryptophan and nitrogenous bases are being studied for better prognosis in cancer patients. Objective: To evaluate the impact of tryptophan and thymine (TT) on carcinogenesis and treatment of bladder cancer with intravesical BCG. Methods: After identifying the inhibitory effect of TT in vitro on multiple cancer cell cultures, the animal model of bladder cancer was induced by intravesical MNU instillations and randomized into four groups: Control (n = 9), BCG (n = 9), TT (n = 7) and BCG + TT (n = 8). The BCG groups received 10⁶ CFU of intravesical BCG in 0.2 ml of saline for 6 consecutive weeks and the TT groups received 1 g / kg (6: 4) of TT via daily gavage. At the end of the protocol, the animals were sacrificed and the urinary bladders were submitted to histopathology, immunohistochemistry and Western blotting. Results: Urothelial cancer was identified in 100%, 85.7%, 44.5% and 37.5% of the Control, TT, BCG and BCG + TT groups, respectively. Cellular proliferation marked by nuclear Ki-67 was greater in Control compared to animals in the other groups (P = 0.03). The BCG, TT and BCG + TT groups showed proliferative cell decline and increased TLR4 / 5 labeling in the urothelium. BCG decreased VEGF urothelial labeling, even in association with T. Conclusion: TT inhibits urothelial carcinogenesis and potentiates intravesical BCG in the treatment of bladder cancer by reducing cell proliferation and activating TLRs.

Keywords: BCG; bladder neoplasia; supplementation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos pesos ao longo do protocolo e média do ganho de peso.....34

Tabela 2 Estágio histopatológico da bexiga e classificação do grau por grupo.35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia do sistema renal e camadas da parede da bexiga.....	13
Figura 2. Cascata do triptofano	21
Figura 3. Fluxograma do experimento.....	28
Figura 4. Ganho de peso dos animais dos grupos estudados	34
Figura 5 Análise por imuno-histoquímica de campos representativos de microfotografia do grupo controle, BCG, TT e BCG+TT.....	36
Figura 6 Barras da escala de coloração Ki-67 representam 20 μ c (P <0,05).....	37
Figura 7 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TRL4	37
Figura 8 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TLR5.....	38
Figura 9. Análise por western blotting de bexiga com expressão de VEGF.....	38
Figura 10 Análise por western blotting de bexiga. Expressão de HIF	39
Figura 11 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TLR2.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Câncer.....	12
1.2. Nutrição e câncer	16
1.3. Triptofano.....	19
1.4. Timina.....	22
1.5. Suplemento de triptofano e timina.....	24
2. OBJETIVO.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. Animais e procedimento experimental	27
3.2. Histopatologia	29
3.3 Extração de Proteínas.....	30
3.3. Western Blotting: TLR2, TLR4, TLR5, HIF e VEGF	30
3.4. Imunomarcacão	31
3.5. Contagem celular e determinação do índice proliferativo (ki67).....	32
3.6. Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Animais experimentais e suplementação.....	33
4.2. Histopatologia	35
4.3.Proliferação de Ki67	36
4.4. Western Blotting TLR2, TLR4, TLR5, HIF e VEGF	37

5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46
8. ANEXOS	54
8.1. Documento de aprovação de uso animal.....	54
8.2. Artigo publicado	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer de bexiga é o tumor mais prevalente em homens, ficando em 7º lugar e o 17º mais prevalente em mulheres, acometendo aproximadamente 110.000 homens e 70.000 mulheres a cada ano no mundo. No Brasil, houve registro de 10.640 novos casos em 2016 (7.590 em homens e 3.050 em mulheres no país), e nos Estados Unidos, a Associação Americana de Câncer estima a ocorrência de 81.400 novos casos para 2020 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; INCA, 2020a).

A maioria dos carcinomas de bexiga urinária (CB) surgem a partir do urotélio. Essa camada se caracteriza por apresentar um epitélio de transição caracterizado por uma camada de células superficiais, intermediárias e basais, e o carcinoma que afeta apenas o revestimento urotelial pode ser papilar e designado como doença pTa (Liakou et al., 2007)

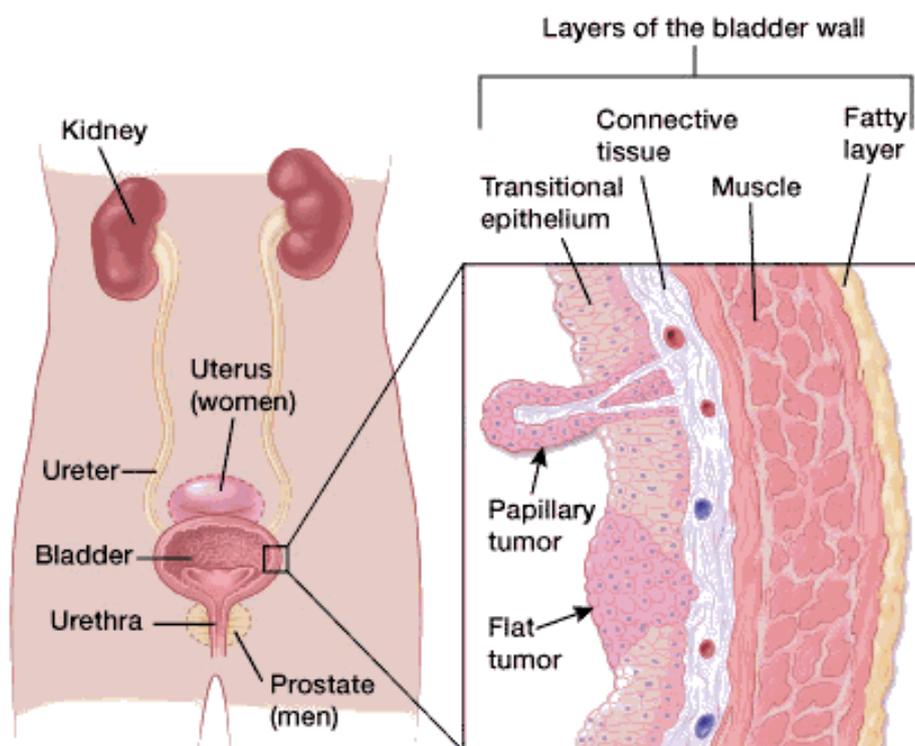
O carcinoma urotelial é o tipo de câncer de bexiga mais comum. As células uroteliais revestem outras partes do trato urinário, como rim, uretra e ureter, portanto é de extrema importância o rastreamento dessas partes para assegurar a existência ou não de tumor. Existe o carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma que são tumores invasivos, carcinomas de células pequenas e os sarcomas que são tumores mais raros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

A bexiga possui várias camadas, e cada camada é constituída por diferentes tipos de células. A maioria dos tumores começam pelo revestimento interno da bexiga que é chamado de urotélio ou epitélio transicional. Conforme ele invade camadas internas, ele atinge estágios superiores e assim se torna mais avançado e mais difícil de ser tratado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; INCA, 2020^a).

Mais de 70% dos CB se apresentam com aspecto papilífero e não-músculo-invasivo (CBNMI) (Reis et al., 2009), incluindo os tumores ao urotélio (Ta), tumores invadindo a lâmina própria (T1) - camada composta por uma fina camada

de tecido conectivo localizado abaixo do urotélio - e carcinoma *in situ* (pTis ou hiperplasia plana) (Liakou et al., 2007; Luo et al., 2013).

Figura 1. Fisiopatologia do sistema renal e camadas da parede da bexiga



Fonte: AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020

O fator de risco mais importante para o CB é o fumo, seguido de exposição do local de trabalho, uso de medicamento para diabetes e uso de suplementos de ervas contendo ácido aristolóquico, arsênico na água potável e a ingestão inadequada de líquidos. Mas sabe que alguns fatores não são modificáveis como raça e etnia, onde brancos tem duas vezes maior chance de desenvolver CB do que afro descendentes, Pessoas com mais de 55 anos e homens são mais acometidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

O uso de animais para estudos com CB tem vantagens, uma vez que a fisiologia e genética dos roedores são bem compreendidas, seu manuseio é mais fácil e barato, onde também compartilham características importantes com humanos, uma vez que são mamíferos. A indução química em roedores é mais facilitada do

que em outros animais, uma vez que seus tumores se desenvolvem rapidamente, em questão de meses (REIS et al., 2008; REIS et al., 2012).

A indução química por M-metil-N-nitrosuréia (MNU) foi descrita em 1972 por Hicks and Wakefield, em contato com o urotélio, o composto foi capaz de induzir danos citotóxicos, levando uma rápida proliferação, permitindo o acúmulo e perpetuação de mutações. Isso depende do pH, sem requerer uma ativação metabólica. Sendo assim em 2012, REIS et al. (2012), demonstrou um modelo de indução de CB em ratos Fischer 344 de 7 semanas, onde o uso de MNU é feito nas semanas 0,2,4,6 e seu tratamento por 6 doses consecutivas semanais (Hicks, R. M; Wakefield, 1972).

Os tratamentos contra o câncer podem se dividir em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, tratamento imunológico, porém a escolha do mesmo vai depender do grau de evolução da doença (INCA, 2017b).

A ressecção transuretral (RTU) é utilizada com frequência para verificar se o câncer invadiu camadas musculares, e é o tratamento mais comum para CB em estágio inicial ou não músculo invasivo. Geralmente esse é o primeiro tratamento quando o câncer é diagnosticado pela primeira vez. Já quando o tumor é invasivo, é necessário a remoção de parte da bexiga, esse procedimento é chamado de cistectomia, e a quimioterapia é administrada antes da cirurgia ser feita (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; INCA, 2020a).

O uso de quimioterápicos pode ser administrada via intravesical, onde o medicamento é instilado diretamente na bexiga, ou via sistêmica (pílulas ou injetáveis) que vão para a corrente sanguínea. Já a radioterapia pode ser realizada após uma RTU, ou juntamente com a quimioterapia para ajudar a irradiar o tumor.

A imunoterapia vem ganhando espaço a cada ano, mesmo já sendo reconhecida a relação imunológica e evolução favorável da doença maligna. Em 1976, (Morales and Eiding, 1976), foram os primeiros a relatar a eficácia da terapia com o uso do bacilo Calmette-Guerin (BCG) para tratamento do CBNMI após RTU sendo este tratamento estabelecido como padrão ouro (Redelman-Sidi et al., 2014)

e demonstrando diminuir os índices de recorrência pós RTU para 31% (Wynberg, et al., 2005).

Desta forma o CB é a única neoplasia maligna em que a imunoterapia é inclusa como parte do tratamento padrão (Sharma et al., 2007). No entanto, a grande preocupação são os efeitos colaterais, dos mais leves a moderados. Esses efeitos podem evoluir, trazendo complicações graves para o pacientes como febre ou reações alérgicas (BÖHLE and BRANDAU, 2003).

O BCG, como tratamento imunoterápico, ativa de uma forma crescente a liberação de citocinas na urina quanto na bexiga. Podemos usar como fator de necrose tumoral (TNF) a expressão de citocinas, fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN) e interleucinas (IL) que induzem resposta de linfócitos T-helper e das células natural killers na bexiga (BÖHLE and BRANDAU, 2003).

Após o uso de BCG, algumas respostas são vistas como infiltrado celular granulomatoso na parede vesical. Essa resposta imune é de longa duração, o que vai depender da correlação que o paciente e resposta de citocinas apresentadas. O BCG é eficaz à redução da recorrência da doença, porém a progressão ainda é incerta. Os pacientes refratários também estão sujeitos a recorrência rápida do tumor (Seager et al., 2009).

A parte mais importante do sistema imunológico é sua capacidade de impedir-se de atacar células normais do corpo. Para isso ele usa o “checkpoint”, que são proteínas que podem ser ativadas ou desativadas para iniciar uma resposta imunológica. Muitas vezes as células cancerígenas usam desses checkpoints para não ser atacada pelo sistema imune. Mas recentemente existem medicamentos inibidores de imuno checkpoint que ajudam a restaurar a resposta imunológica contra o tumor através das células T (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Os principais alvos são as proteínas T-linfócito-Associada citotóxico 4 (CTLA4), proteínas programa de morte celular 1 (PD1) e o ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), que tem a função de amortecer as respostas imunes inflamatórias.

Em 2018, o prêmio Nobel premiou dois pesquisadores que estabeleceram um mecanismo totalmente novo para a terapia do câncer. James P. Allison estudou basicamente uma proteína que funciona como freio no sistema imunológico, sendo capaz de “liberar” esse freio para atacar os tumores. Em paralelo, Tasuku Honjo descobriu uma proteína nas células do sistema imune que também funciona como freio, mas com mecanismo de ação diferente. Todos esses estudos iniciaram na década de 90, onde James Allison observou que CTLA-4 funcionava como esse freio, porém ele havia desenvolvido um anticorpo que poderia se ligar a CTLA-4 e bloquear essa função. Com novos estudos, mostrou-se que PD-1 funcionava também como um freio de célula T porém com um mecanismo diferente (Nobel, 2018).

Estratégia visando a terapia de checkpoints contra PD-1 tem se mostrado eficaz no tratamento de câncer de bexiga além de outros tumores como pulmão, câncer renal, linfoma e melanoma.

1.2. Nutrição e câncer

A detecção de nutrientes que regulam as respostas do sistema imune ao câncer vem avançando, tentando identificar como as células cancerosas são capazes de suprir a imunidade antitumoral, esgotando assim nutrientes essenciais, como por exemplo o triptofano, reduzindo sua capacidade de proteção (SULLIVAN et al, 2019).

Devido as interações entre nutrição, barreira intestinal e imunorregulação o foco em fórmulas nutricionais vem progredindo, por seus benefícios adicionais. A terapia imunomoduladora, estudada desde 90, é caracterizada por ser enriquecida de nutrientes especiais com possível efeito terapêutico nos sistemas vitais como sistema imune e respiratório, e órgãos como intestino e fígado (SKELLY et al 2019).

Os imunonutrientes podem contribuir para a diminuição das complicações pós-cirúrgicas e para uma melhor recuperação do peso, tendo grandes chances de

influenciar significativamente na sobrevivência do paciente oncológico (Braga et al., 2013; Braga and Sandrucci, 2016; McClave et al., 2016).

O sistema imunológico de um paciente oncológico passa por diversos processos inflamatórios, incluindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e formação de oxigênio e nitrogênio reativos. A produção excessiva dessas citocinas pode levar a uma inflamação crônica (MARTIN, FERGUSON, 2004).

A imunonutrição tem sido estudada como tratamento auxiliar em pacientes diagnosticados com tumores que são submetidos a tratamento cirúrgico. Ácido graxo poli-insaturados como ômega-3 (PUFA), zinco, arginina, glutamina e nucleotídeos mostraram potencial de reduzir complicações pré e pós-operatórias (ESPEN, 2017).

Podemos observar que a agressividade do tumor, sua localização, as condições clínicas, imunológicas e nutricionais, podem se agravar pelo diagnóstico tardio. Esses fatores comprometem o estado nutricional do paciente e consequentemente podem interferir no prognóstico e tratamento da doença (SHILS et al, 2003).

Quando o paciente oncológico se encontra em um quadro de desnutrição, seu sistema imune fica prejudicado, apresentando queda de imunoglobulinas, redução do número de CD4 e linfócitos T, e também na diminuição da função dos neutrófilos, o que aumenta a disposição às infecções de feridas, sepse abdominal e pneumonia pós-operatória (MOREIRA; WAITZBERG, 2000). Com isso, a desnutrição pode colaborar para o surgimento de complicações no período pós-operatório, o que gera um aumento do tempo de internação e até mesmo comprometendo sua qualidade de vida.

Glicose, aminoácidos e ácido graxos são substratos básicos para o desenvolvimento do câncer, assim como o do sistema imune, desempenham papel importante no metabolismo central. Porém, as células cancerígenas podem fazer com que as vias metabólicas centrais sejam desreguladas, e isso depende fatores como por exemplo microambiente e proliferação, ou até mesmo resistência a drogas (SULLIVAN et al 2019).

Em um estudo multicêntrico realizado no Brasil, mostrou que a desnutrição incide três vezes mais em pacientes oncológicos, onde 66,3% dos pacientes apresentavam algum tipo de magreza. O tipo de tratamento também foi estudado, sendo que ele pode influenciar no estado nutricional do indivíduo. (TARTARI et al., 2010).

Sabe-se que 65% dos pacientes submetidos a cirurgia para tumores de trato gastrointestinal apresentam desnutrição, devido à caquexia tumoral e/ou à diminuição da ingesta calórica. E metade dos pacientes submetidos a cistectomia total morre dentro de cinco anos, devido a sua agressividade podendo progredir para uma doença metastática. Pacientes com câncer de bexiga músculo invasivo tem maior chances de apresentar sarcopenia (HAMILTON-REEVES et al., 2018). Sabe-se que a proporção de neutrófilos para linfócitos está associado com piores desfechos para CBNMI.

Alguns suplementos nutricionais têm se mostrado eficiente na diminuição da intensidade de efeitos adversos da quimioterapia, muitas vezes até mesmo impedindo o seu o aparecimento (Sieja and Talerczyk, 2004).

Alguns experimentos relacionados aos efeitos benéficos de aminoácidos sobre a nefrotoxicidade e toxicidade provocada por quimioterápicos já foram avaliados (Del Arco et al., 2003; KRONING et al., 2000). Estudos mostram os efeitos benéficos da administração de alguns nutrientes como zinco, selênio, glutamina e ômega 3 na forma de suplementos nutricionais na prevenção, evolução e tratamento adjuvante de diversas patologias. Inclusive alguns trabalhos consideram o envolvimento do triptofano (aminoácido) na ação de macrófagos. Estas células participam do sistema imune ativando os linfócitos T, que por sua vez, exercem efeitos sobre os macrófagos com uma interação bi-direcionais (Munn et al., 1999).

Já é sabido que os nutrientes exercem funções importantes no organismo, porém ainda não é totalmente conhecida sua atuação como coadjuvante ao estabelecimento e ao tratamento do câncer. Os mecanismos sugeridos para os nutrientes são de produzir enzimas que ajudam a bloquear a ação do cancerígenos,

evitar a ação e formação de radicais livres, desativar compostos que promovem o desenvolvimento do câncer, ou ainda interferir na ação efetiva do sistema imune ou eventos que produzem uma resposta inflamatória. Vários nomes são citados para esses alimentos, como por exemplo alimentos funcionais ou nutracêuticos, que possuem a capacidade de agir como os medicamentos. São na maioria nutrientes que são ativos farmacologicamente e desempenham função imunomoduladora (Cozzolino, 2012).

A arginina é um aminoácido não essencial que serve de substrato para células imunes, desempenhando um papel fundamental no reparo do tecido conjuntivo. Sua deficiência é marcada pelo comprometimento de resposta adaptativa das células T. Já o ômega 3 tem funções anti-inflamatórias, reduzindo interações entre plaquetas e leucócitos, estimulando a produção de glutathione que pode diminuir a lesão oxidativa. A glutamina por sua vez é fonte de combustível para macrófagos, linfócitos e enterócitos, além de participar da sinalização celular, assim sua suplementação é de extrema importância e sua deficiência pode levar um comprometimento da função imunológica e degradação da função epitelial do intestino (PIETRO et al, 2017).

1.3. Triptofano

O triptofano (Trp) é um aminoácido essencial encontrado na forma de cristal de cor branca ou pó cristalino sem odor, com um sabor levemente amargo, e pode ser encontrado em alimentos como nozes, peixes, queijos brancos, carnes magras e leguminosas. Ele é encontrado em menores quantidades na dieta habitual, assim a falta do mesmo pode afetar funções metabólicas (Markus et al., 2008). Sua absorção ocorre no intestino pelo processo de absorção dos aminoácidos, sendo que 80% se liga à albumina e o restante fica na forma livre (keszthelyi et al., 2009).

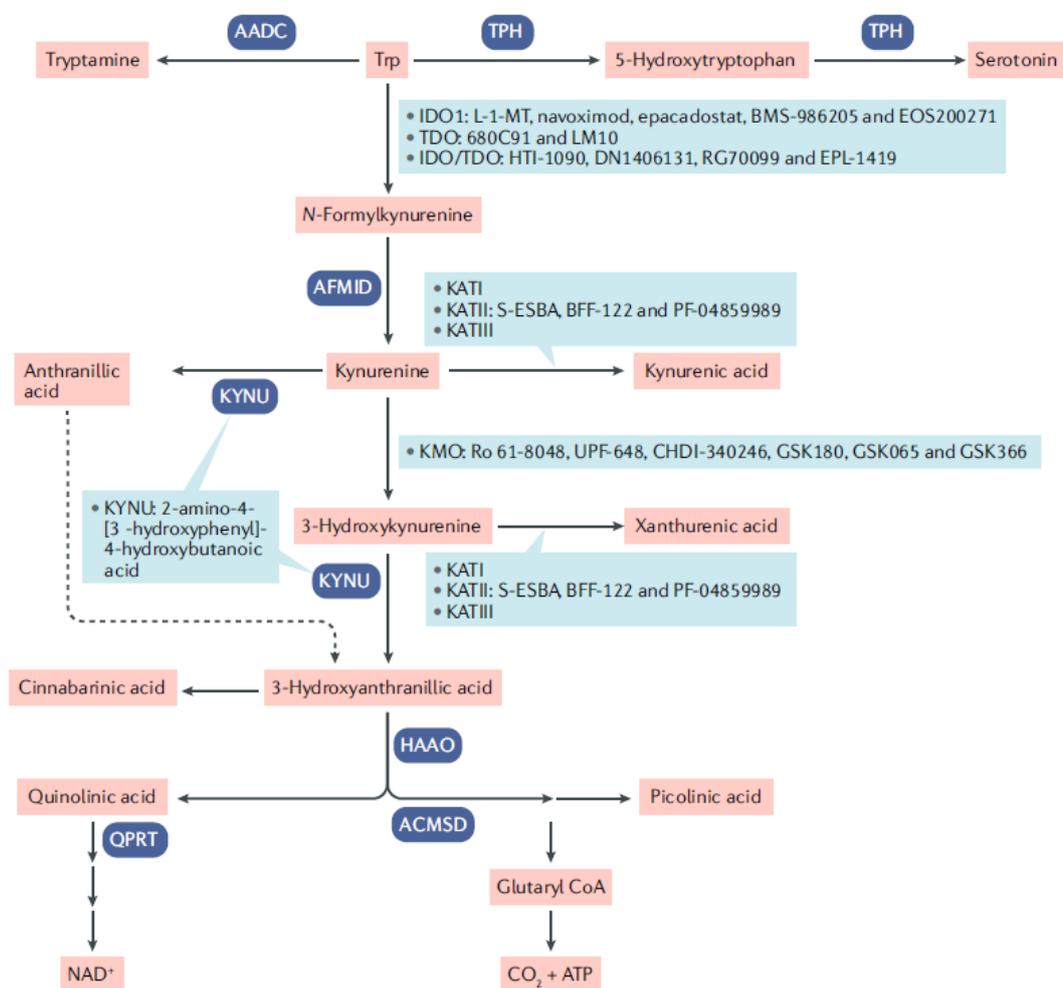
O tempo de meia vida é determinado pelo seu processo metabólico, seja ele hepático ou extra-hepático. Temos duas vias metabólicas, onde a primeira é reversível e tem como função a inclusão do triptofano na síntese proteica no fígado e em outros tecidos. Já a segunda rota é irreversível pois possui a enzima hepática, conhecida como triptofano pirolase (Winter and Christensen, 1964).

O Trp como seus metabólitos tem funções importantes em processos fisiológicos que vão de crescimento e manutenção celular como seus metabólitos podem atuar como neurotransmissores e moléculas de sinalização. Assim é de extrema importância uma vez que se tornou parte da comunicação celular (PLATTEN et al, 2019).

Este aminoácido essencial também é precursor de serotonina (5-HT), derivando quinurenina e ácido nicotínico (niacina), com função de modular múltiplos processos fisiológicos e psicológicos no organismo. Além da serotonina ele é convertido em melatonina na glândula pineal. Encontramos melatonina em várias estruturas celulares, como o núcleo, membranas celulares e mitocôndrias, e sua função é atuar contra os radicais livres, protegendo o DNA dos efeitos adversos do estresse oxidativo (Bandyopadhyay et al., 2001; Cuzzocrea and Reiter, 2001; Karbownik et al., 2000; Reiter et al., 2000; Vural et al., 2001).

Os níveis de Trp no corpo são determinados pela ingestão de alimentos e pelas atividades de várias vias metabólicas. Além de ser precursor de serotonina mais de 95% do Trp livre é substrato para a via de quinurenina (Figura 2).

Figura 2. Cascata do triptofano



Fonte: PLATTEN et al, 2019

Estudos apontaram resultados controversos, em relação a excreção de alguns metabólitos e a ação de certos carcinógenos, bem como a relação positiva entre câncer de bexiga e excreção de triptofano na urina, e que o trp é capaz de manter sua capacidade de multiplicação e diferenciação de linfócito T, o que interfere na progressão tumoral (Dunning et al., 1950; Yoshida et al., 1971; Young, 1986).

A expressão das enzimas idoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e triptodano-2,3-dioxigenase (TDO) está aumentada e relacionada com a progressão do tumor e prognóstico do paciente. Altos níveis dessas enzimas afetam o sistema imune,

inibindo a proliferação de células T, restringindo a infiltração do tumor, ondeIDO induz um mecanismo de contra regulação em resposta de citocinas Recentemente, inibidores destas enzimas têm sido propostos como agentes terapêuticos em associação com inibidores de “imuno checkpoints” (LEMOS et al, 2019; PLATTEN et al, 2019).

O desequilíbrio entre o Trp e seus metabólitos estão associados com uma série de patologias, incluindo depressão, doenças auto imunes, neuro degeneração e câncer. No câncer, níveis altos de IDO1 e TODO resultam na supressão da imunidade antitumoral.

Há fortes evidências que o metabolismo do Trp tem papel importante no câncer, fazendo com que haja uma supressão do sistema imune e conseqüentemente uma progressão tumoral, aumentando propriedade cancerígenas. As enzimas de degradação (IDO e TODO) estão associadas com diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, tumores ginecológicos, neoplasias hematológicas e câncer de bexiga (M. Li et al., 2019).

Há evidências que sua degradação regula as células T, aumentando expressão de FOXP3+, CD3, CD4, CD8 e CD25. Sendo que seus metabólitos tem alto potencial de promover motilidade e metástase das células cancerosa (Sakaguchi et al., 2010).

1.4. Timina

Os nucleotídeos são compostos derivados de purina ou pirimidinas e nas últimas três décadas surgiram evidencias que esses compostos estão envolvidos com o sistema imunológico, principalmente em seu desenvolvimento e crescimento. Eles participam da maturação, ativação e proliferação de linfócitos, estimulando a função fagocítica de macrófagos, modulando o retardo da resposta contra o tumor (HESS, GREENBER, 2012).

A timina é uma base nitrogenada que está sendo formada constantemente no interior das células. Um nucleotídeo é formado por uma base

nitrogenada, um açúcar, do tipo pentose, e um grupo fosfórico (ALBERTS, *et al.*, 1997).

As vias das pirimidinas são reguladas por retroalimentação e inibição. Assim o órgão responsável pela utilização e degradação da tiamina ingerida é o fígado, sendo que sua degradação pode levar à formação de uréia (Sonoda and Tatibana, 1978).

Estudos realizados com animais mostraram que o consumo de bases nitrogenadas traz benefícios na saúde e sobrevivência, assim um dos maiores benefícios seria o aumento da longevidade (Sonoda and Tatibana, 1978). Outro aspecto importante se faz a sua deficiência, pois a falta da ingestão de ácidos nucléico altera a imunidade celular, liberação de citocinas por macrófagos e a resposta a mitógenos pelas células T. O uso de nucleotídeos melhora essas atividades, entretanto, os estudos ainda são insuficientes para comprovar essas respostas em diferentes tipos de tumores. Não existem relatos na literatura sobre a administração de bases nitrogenadas, por via oral, com objetivos terapêuticos.

A timina desempenha papel importante no sistema e na carcinogênese uma vez que produz alguns metabolitos chaves, como é o caso da timidina fosforilase (TF), que é uma enzima do metabolismo nucléico que desempenha um papel importante na via de salvamento da pirimidina. Está associada a recuperação celular devido a estresse patológico e a manutenção de mitocôndrias (Sonoda and Tatibana, 1978).

No contexto câncer, a TF desempenha papel importante na angiogênese, replicação e reparo do DNA, atuando como um fator anti-apoptótico através de inibição farmacológica ou deleção genética, o que faz com que sua super expressão esteja relacionada com um prognóstico ruim (Haraguchi *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1989; Nishigaki *et al.*, 2003; Toi *et al.*, 2005). A expressão de TF está sendo estudada em diversos tipos de câncer (Bronckaers *et al.*, 2009), dentre eles carcinoma de bexiga.

1.5. Suplemento de triptofano e timina

Os suplementos alimentares ligados ao sistema imunológico vêm sendo estudados, sendo conhecidos como nutrientes imunomoduladores, que são aqueles que de alguma forma diferem nas respostas imunológicas, assim trazendo respostas promissoras para melhora dos indivíduos frente a patologias e infecções. Assim, surge o suplemento nutricional de triptofano e timina (TT), uma junção entre um aminoácido, o triptofano, e uma base nitrogenada, a timina. Estudos com o suplemento apontam para efeitos benéficos como coadjuvante no tratamento anti-neoplásico, com melhora na qualidade de vida e redução dos efeitos adversos da quimioterapia (Monteiro, 2006).

O bioquímico Friedrich Lavitschka (falecido em 1998), do Instituto Biológico de São Paulo foi quem originalmente desenvolveu a suplementação. Os estudos com TT são recentes, mas de início ele foi empregado em modelos animais que possuíam úlceras, e os resultados obtidos mostraram que o suplemento tinha função anti-ulcerogênica, por possível ação protetora (Monteiro, 2006). Em seguida, foi estudada a toxicidade em animais com diferente linhagens celulares de tumor. A resposta ao TT foi bem tolerada e evitou a proliferação celular (Monteiro, 2006; PRESTES, 2010).

Em estudos com humanos, o TT foi administrado afim de verificar sua tolerância, bem como avaliar os efeitos do aminoácido isolado e em associação a base nitrogenada. Os resultados mostraram boa tolerabilidade e quando administrados juntos, não há mudanças na cascata do Trp (PRESTES, 2010).

Visto que IDO e TDO degradam triptofano (Grohmann et al., 2017; Speiser et al., 2016), e TF degrada timina, torna-se de grande importância o entendimento de novos mecanismos destes componentes, e como eles podem interferir na resposta terapêutica, especificamente quando envolve imunoterapia como é o caso do BCG intravesical no câncer de bexiga.

A estratégia proposta neste estudo se baseia nestas experiências prévias de interferência dupla no metabolismo e na modulação do sistema imune,

representados pela suplementação e pela imunoterapia intravesical com BCG, respectivamente.

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto do triptofano e da timina (TT) na carcinogênese e no tratamento do câncer de bexiga não-músculo invasivo com BCG intravesical.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais e procedimento experimental

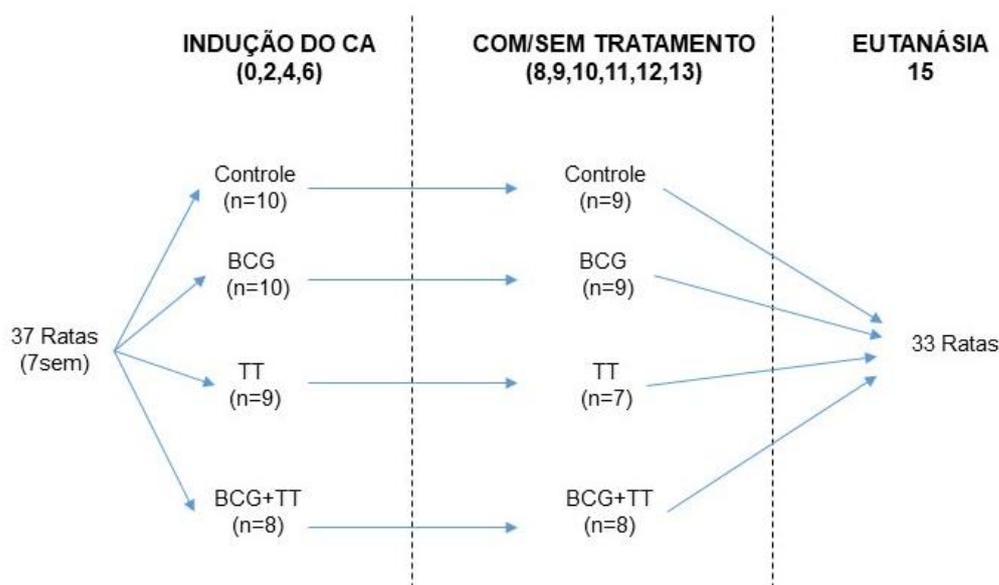
Foram utilizados 37 ratos fêmeas da linhagem Fisher 344, obtidos no Centro de Biotério de Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) com 4 semanas de vida, o que corresponde a um animal jovem, e ambientados no biotério até completarem idade para início do experimento com 7 semanas, fase madura, com peso médio de 150g.

Os animais foram retirados na medida dos nascimentos fornecidos pelo CEMIB. Uma vez que não se tinha o número total de ratos, os mesmos foram alocados em 4 grupos: Controle (n=10), BCG (n=10), TT (n=9) e BCG + TT (n=8). O protocolo foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal local (CEUA/ UNICAMP) 4582-1/2017.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (Figura 3):

- Controle: Indução com MNU, tratamento com soro, gavagem com água+DMSO.
- BCG: Indução com MNU, tratamento com BCG, gavagem com água+DMSO.
- TT: Indução com MNU, tratamento com soro, gavagem com TT+DMSO desde o início.
- BCG+TT: indução com MNU, tratamento com BCG, gavagem com TT+DMSO desde o início.

Figura 3. Fluxograma do experimento



A padronização do protocolo já é estabelecida em nosso grupo. A indução de CB utiliza *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - *Sigma*) via intravesical (Reis et al., 2010). Para a indução do CB, os animais, com 7 semanas de idade, foram anestesiados pela via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg) e cloridrato de cetamina 10% (60mg/kg). Foi instilada uma dose de 1,5 mg/kg MNU dissolvida em 0,2 mL de solução fisiológica na bexiga dos animais, a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Reis et al., 2012). Antes da aplicação, as bexigas dos animais foram esvaziadas para manter a alta concentração dos compostos administrados.

Os animais receberam o suplemento nutricional de TT (6:4) (cedido gentilmente pela Prof. Maria Linarelli), via oral por gavagem orogástrica, em uma única dose diária. A dose administrada nos animais (1000 mg/kg de peso corporal/dia). O volume administrado para cada animal foi de 1% do seu peso corpóreo. Para diluição da suplementação, foi usado por 1 semana 1g de TT para 10ml de tampão bicarbonato, porém os resultados não foram satisfatórios fazendo com que a diluição fosse feita em Dimetilsulfóxido (DMSO) e água. A proporção de

suplemento, DMSO e água foram de 1g, 1ml e 10ml respectivamente. Os animais do grupo controle e BCG, receberam o mesmo veículo durante o experimento.

Todos os animais permaneceram em gaiolas com limite máximo de 5 animais, número máximo permitido pelo CEUA, e receberam água e dieta sólida padrão para roedores ad libitum (Nuvilab). As medidas do peso corporal dos animais foram feitas semanalmente em balança semi-analítica Marte AS 5500.

Por 6 semanas consecutivas os animais dos grupos BCG e BCG + TT receberam uma dose intravesical de 10^6 UFC – 1 mg de BCG (*Fundação Atauilpho de Paiva*) diluída em 0,2 mL de solução fisiológica (Reis et al., 2012).

Ao decorrer do experimento tivemos 4 óbitos, 2 deles na anestesia, 1 por perfuração de artéria e 1 por hematoma no períneo. Os óbitos ocorreram entre a segunda e quarta semana da fase de indução do carcinoma. Finalizando assim com grupo Controle (n=9), BCG (N=9), TT (n=7) e BCG + TT (n=8).

Os animais foram eutanasiados ao final do protocolo (15 semanas), por via veia caudal, com uma overdose de anestésico Tiopental sódico (Cristália, São Paulo, Brasil). A bexigas foram retidas e seccionadas em duas partes em corte sagital para histopatologia/imunohistoquímica e Western Blotting.

3.2. Histopatologia

Uma parte da bexiga de cada animal foi coletada e fixada em paraformaldeído 4% por no mínimo 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram desidratados com diferentes concentrações de álcool (80%, 90%, 100% I e 100% II). Os fragmentos foram diafanizados em xilol por 25 minutos, imersos em parafina I e II e incluídos em blocos de parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus®*), previamente identificados.

Para secção dos materiais, foi utilizado o micrótomo rotativo *Biocut 1130* (*Reichert-Jung*, Munique, Alemanha) com espessura de 5 μ m. Os cortes foram corados em Hematoxilina-Eosina. Para isso as lâminas foram desparafinizadas em

estufa e reidratadas na bateria de banhos: xilol 100% (10 min), etanol 100% (5 min), etanol 95% (5 min), etanol 80% (5 min), etanol 70% (5 min) e água destilada (5 min). Em seguida, as lâminas foram imersas em Hematoxilina de Erlich por 1 min, lavadas 3 vezes em água corrente e em água destilada, e imersas em Eosina alcoólica 0,5% por 4 segundos. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas por 5 minutos em cada banho (etanol 95%, etanol 100%, etanol/xilol, xilol 100%).

As lâminas foram avaliadas em microscópio e fotodocumentadas e os diferentes grupos experimentais classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde e União Internacional Contra o Câncer (UICC) para carcinoma de bexiga em humanos (Epstein et al., 1998) com o auxílio de patologista.

3.3 Extração de Proteínas

Os tecidos coletados foram colocados em tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1 mg/ml aprotinina), e homogeneizados com Politron PTA 20S Generator, e os extratos obtidos foram centrifugados à 4°C por 40 minutos à 11.000 rpm.

3.3. Western Blotting: TLR2, TLR4, TLR5, HIF e VEGF

Ao extrato total de proteínas foi adicionado o tampão de Laemmli contendo DTT 100mM e aquecidos a 100°C em banho seco por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em cuba de mini gel da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluído. O gel foi submetido à corrente de 60 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento, e 100 volts até o final do gel de resolução. Após a eletroforese, as proteínas década gel foram transferidas eletricamente para

membrana de nitrocelulose por 90 minutos à 120 volts (LAEMMLI 1970; Towbin et al., 1979).

As membranas foram transferidas e bloqueadas com solução de leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%, por 1 horas à temperatura ambiente. Foi utilizada para lavagem solução basal, e posteriormente incubadas com anticorpos primários (*Santa Cruz Biotechnology, INC*) TLR2 (H-175): sc-10739, TLR4 (M-300): sc-30002, TLR5 (M-300): sc-30003, HIF (H-206): sc-10790 e VEGF (147): sc-507. e mantidas à 4°C overnight com agitação.

Em seguida, as membranas passaram por uma lavagem e incubação com os respectivos anticorpos secundários diluídos em BSA por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, e então foram novamente lavadas. As proteínas marcadas foram fotodocumentadas e a intensidade das marcações obtidas dos diferentes anticorpos foram quantificadas por densitometria através do programa Image Lab.

3.4. Imunomarcção

As amostras de bexiga, as mesmas utilizadas para análise histopatológica, foram submetidas à imunomarcção através do seguinte procedimento. As lâminas foram desparafinizadas com xilol 100%, hidratadas com diferentes concentrações de etanol (100%, 90%, 80%, 70%) e lavadas com água destilada e mantidas em solução basal. Em seguida foram imersas em tampão citrato 0,01mol/L, pH 6,0 e recuperação antigênica do tecido foi realizada em forno micro-ondas 1 minuto em potência alta e 9 minutos em potência média e resfriadas à temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado (1% H₂O₂ em metanol) por 10 min e bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 3% por 1 h. Os cortes histológicos foram incubados *overnight* à 4°C com anticorpo monoclonar anti Ki-67 (Millipore – ab1667) diluído em BSA 1%. No outro dia foi realizada três lavagens de 5 minutos com solução basal. A revelação foi feita com a solução cromógena de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Aldrich*). Após a contra coloração com Hematoxilina de Erlich as lâminas foram fotografadas através do fotomicroscópio *Zeiss Axio Imager A2* (*Zeiss*).

3.5. Contagem celular e determinação do índice proliferativo (ki67)

Após imunomarcção, dez campos microscópicos de cada corte com objetiva de 40x foram contados para células imunopositivas.

A análise quantitativa das células infiltradas foi realizada através da contagem manual das células com o *software ImageJ 1.50b* (*National Institute of Health, EUA*) e o número médio de células marcadas por animal foi calculado a partir do número total de área fotografada e estes valores convertidos em células/mm² (RICHARDSEN et al., 2008). Além disso, considerando os prós e contras da contagem manual versus automática de células e para diminuir margem de erro na quantificação das imunomarcções, índice de correção será obtido através da razão entre contagem manual e automática de um mesmo campo e aplicado para cada imunomarcção.

3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados e apresentados como média \pm DP (desvio padrão). Usamos o teste estatístico ANOVA para analisar as diferenças entre os grupos e o teste post hoc de Bonferroni para múltiplas comparações não pareadas de médias. Foi adotado $p < 0,05$ para nível de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Animais experimentais e suplementação

Ao início do experimento tínhamos 37 animais randomizados em quatro grupos. O sexo do animal foi escolhido devido a sua facilidade de acesso a bexiga, uma vez que em ratos machos a fisiologia da uretra é em forma de S, fazendo com que a instilação dos medicamentos não seja efetiva devido aos altos índices de óbito por perfuração. A linhagem Fischer 344 foi usada por ter resposta fisiologica mais parecida com o humano quando induzido carcinoma de de bexiga.

Ao decorrer do protocolo houve quatro óbitos, dois deles por erro de anestesia, onde a dose foi maior que o peso do animal. Dois por erro mecânico, onde a anestesia não foi realizada corretamente atingindo uma artéria e outro ocasionando um hematoma no períneo. Os óbitos ocorreram entre a segunda e quarta semana da fase de indução do carcinoma. Finalizando assim com 33 animais, Controle (n=9), BCG (N=9), TT (n=7) e BCG + TT (n=8).

O peso dos animais foi aferido uma vez por semana ao longo do protocolo. A evolução do peso foi importante em todos os grupos, uma vez que a perda de peso não era esperada por se tratar de um câncer não-músculo invasivo. Para acompanhamento foi realizado a média dos pesos dos animais de cada grupo (Figura 4). Ao decorrer da nona semana, três animais estavam mais debilitados, havendo a necessidade de isolamento, uma vez que o mesmo poderia ser morto por outros animais, por um período até a recuperação. Visto média de ganho de peso dos grupos, podemos analisar que o grupo que teve tratamento com BCG apresentou melhor resposta.

Figura 4. Ganho de peso dos animais dos grupos estudados

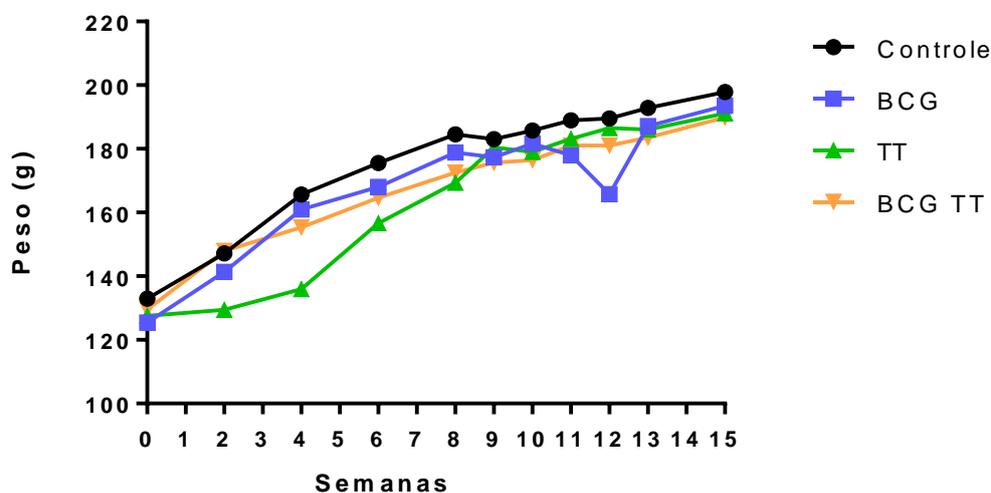


Tabela 1. Média dos pesos ao longo do protocolo e média do ganho de peso

	Controle	BCG	TT	BCG TT
1MNU	132.92	125.49	127.52	129.61
2MNU	147.12	141.35	129.46	147.88
3MNU	165.69	160.95	135.97	155.30
4MNU	175.58	168.09	156.66	164.69
1BCG	184.60	178.87	169.30	172.60
2BCG	183.08	177.31	180.40	175.65
3BCG	185.72	181.69	179.10	176.35
4BCG	188.97	177.94	183.18	181.09
5BCG	189.60	165.76	186.58	181.05
6BCG	192.87	187.17	186.10	183.55
EUT	197.89	193.57	191.13	189.83
Méd ganho de peso	64.97	68.08	63.61	60.21

Para diluição da suplementação, foi usado por uma semana, um grama de TT para 10ml de tampão bicarbonato, porém os resultados não foram satisfatórios

fazendo com que a diluição fosse feita em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada. A proporção de suplemento, DMSO e água foram de 1g, 1ml e 10ml respectivamente.

4.2. Histopatologia

A Tabela 2 mostra o estágio histopatológico completo e classificações de notas por grupo. Uma tendência clara para a limitação da carcinogênese foi observada com 100% e 85,7% dos cânceres uroteliais encontrados em Controle e TT grupos suplementados, respectivamente. E otimização BCG com 44,5% e 37,5% de tumores residuais identificados em grupos de suplementação de BCG e BCG TT, respectivamente.

Tabela 2 Estágio histopatológico da bexiga e classificação do grau por grupo.

Histopatologia	Controle = 9	TT = 7	BCG = 9	BCG-TT = 8
Normal/ Hiperplasia			22,2%	37,5%
Tumor intraepitelial de baixo grau		14,3%	33,3%	25,0%
Tumor papilar (pTa) de baixo grau	44.4%	28,6%	22,2%	25,0%
In situ (pTis) de alto grau	22.2%	28,6%	22,2%	12,5%
Câncer não músculo invasivo (pT1) de alto grau	33.3%	28,6%		
Câncer urotelial	100%	85,7%	44,5%	37,5%

4.3. Proliferação de Ki67

O índice proliferativo, marcado por Ki-67, foi maior no grupo controle comparado aos animais dos demais grupos ($p < 0,05$). Notamos especialmente índices menores no grupo BCG TT. O grupo BCG mostrou maior declínio das células proliferativas comparada ao grupo TT e BCG TT. (Figura 5). Além disso, a taxa de proliferação para apoptose foi menor nos grupos com suplementação indicando uma predominância de proliferação na renovação celular como mostra a Figura 6.

Figura 5 Análise por imuno-histoquímica de campos representativos de microfotografia do grupo controle, BCG, TT e BCG+TT

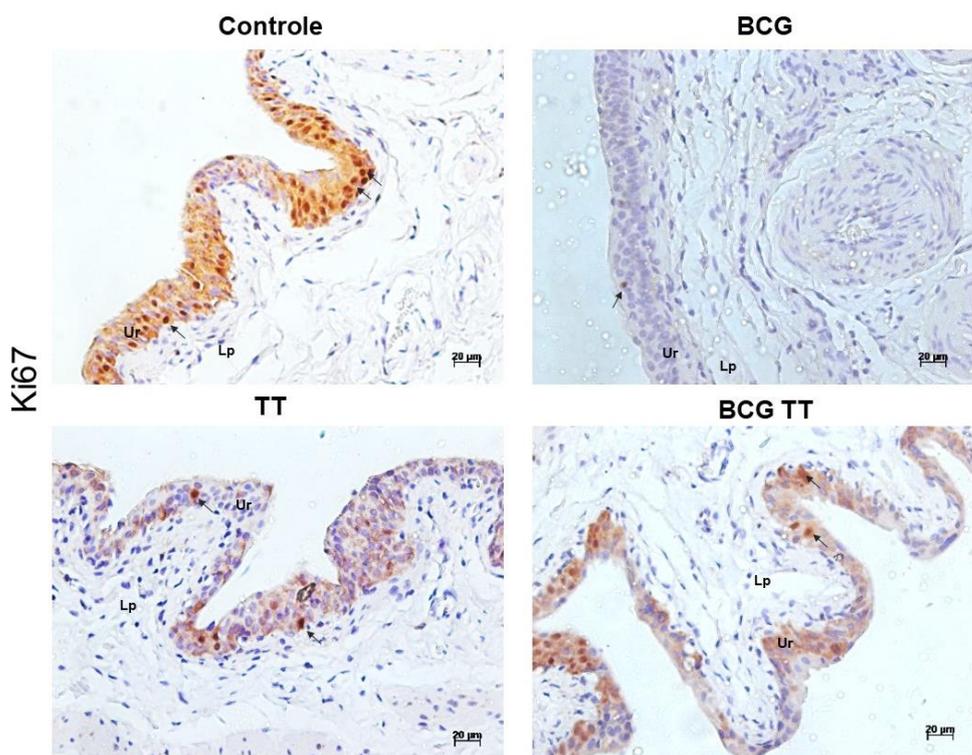
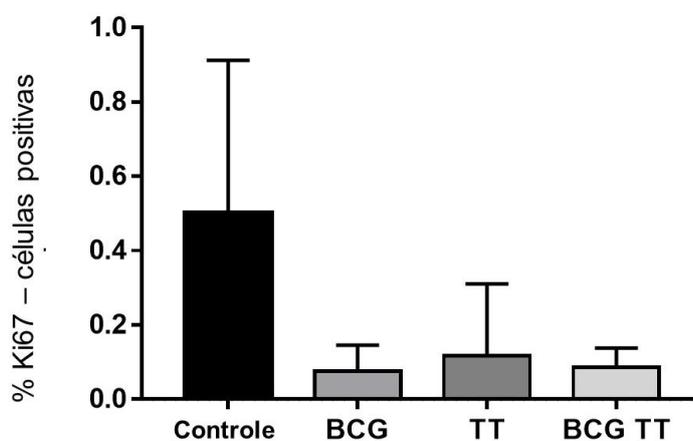


Figura 6 Barras da escala de coloração Ki-67 representam 20 μ c (P <0,05)



4.4. Western Blotting TLR2, TLR4, TLR5, HIF e VEGF

A análise da proteínas TLR4 nas amostras de bexiga mostrou um aumento da presença nos grupo que contiam uso de triptofano e timina isolado e associado ao BCG (Figura 7). O mesmo acontece com a proteína TLR5, que apresenta uma diminuição da sua presença no grpo controle (Figura 8).

Figura 7 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TLR4

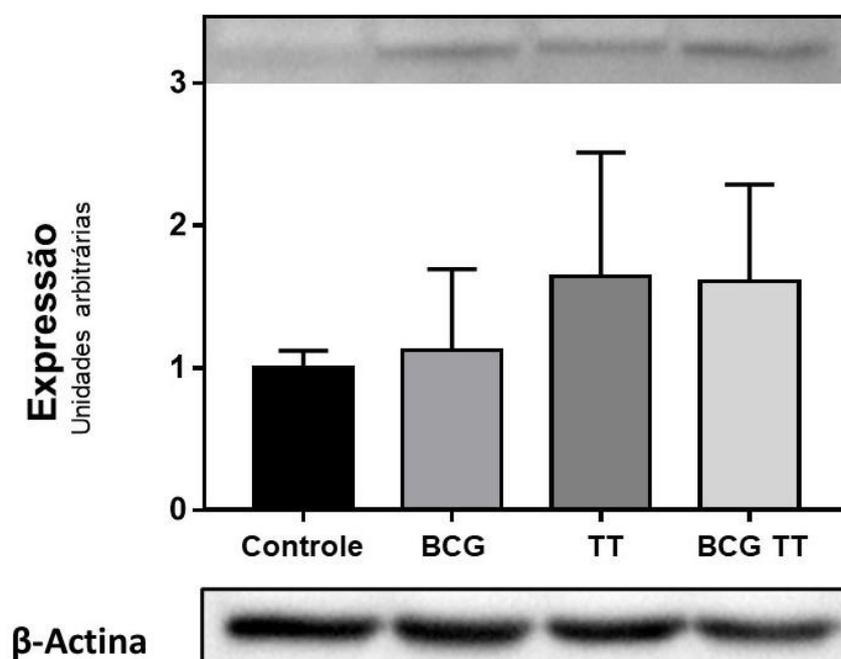
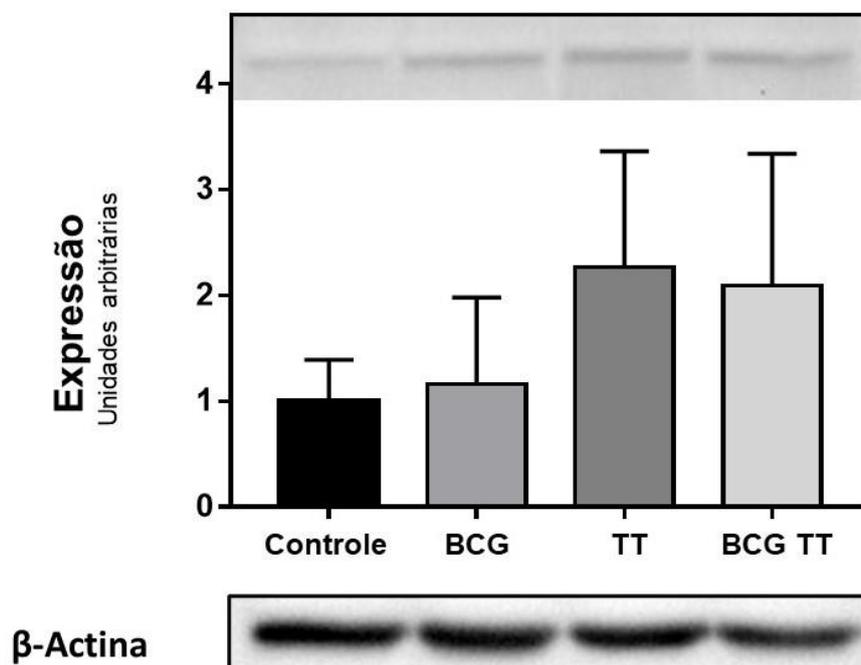
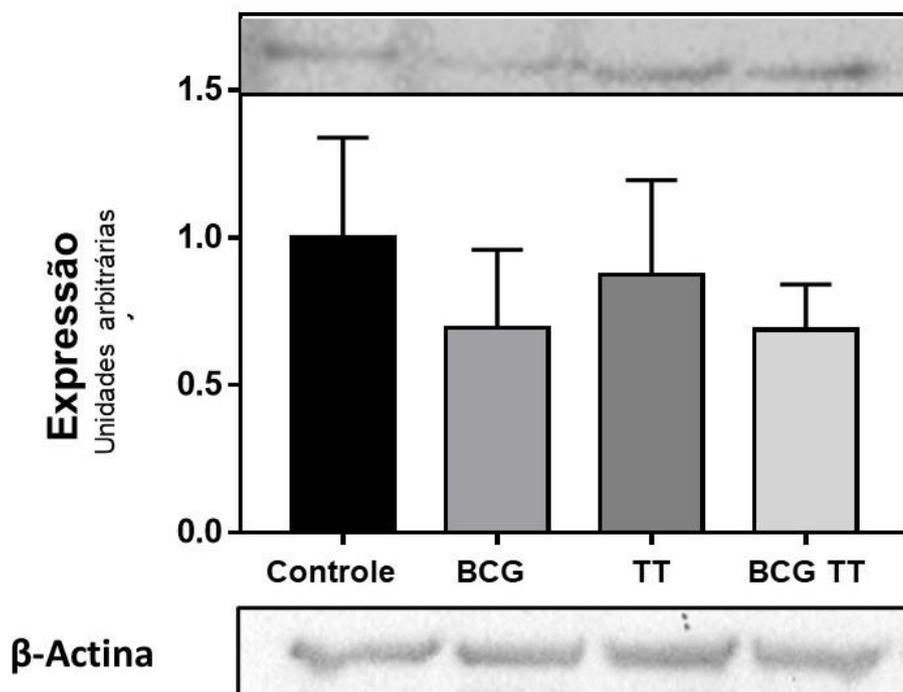


Figura 8 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TLR5

Em contraste, a presença da proteína VEGF foi regulada positivamente no grupo câncer e no grupo sem tratamento com BCG, mostrando uma diminuição importante nos grupos que contiam tratamento com BCG (Figura 9).

Figura 9. Análise por western blotting de bexiga com expressão de VEGF

Ao analisarmos a expressão da proteína de fator indutor de hipoxia (HIF), vimos uma resposta foi modulada pelo uso do suplemento, porém não foi estaticamente significativa $P > 0,5$ (Figura 10). E a expressão da proteína TLR2 não foi ativada no grupo suplementação, porém não foi significativa quando correlacionada com os outros grupos. (Figura 11).

Figura 10 Análise por western blotting de bexiga. Expressão de HIF

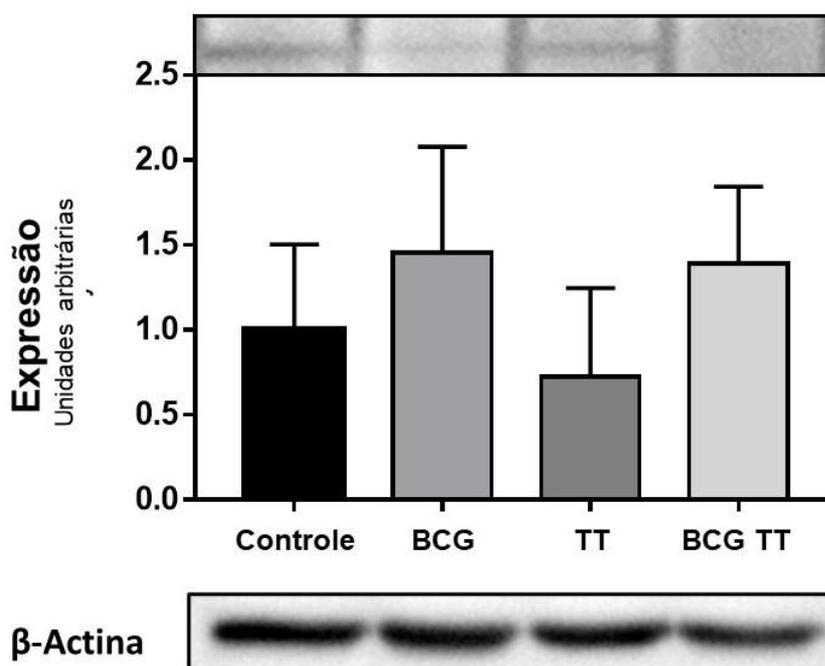
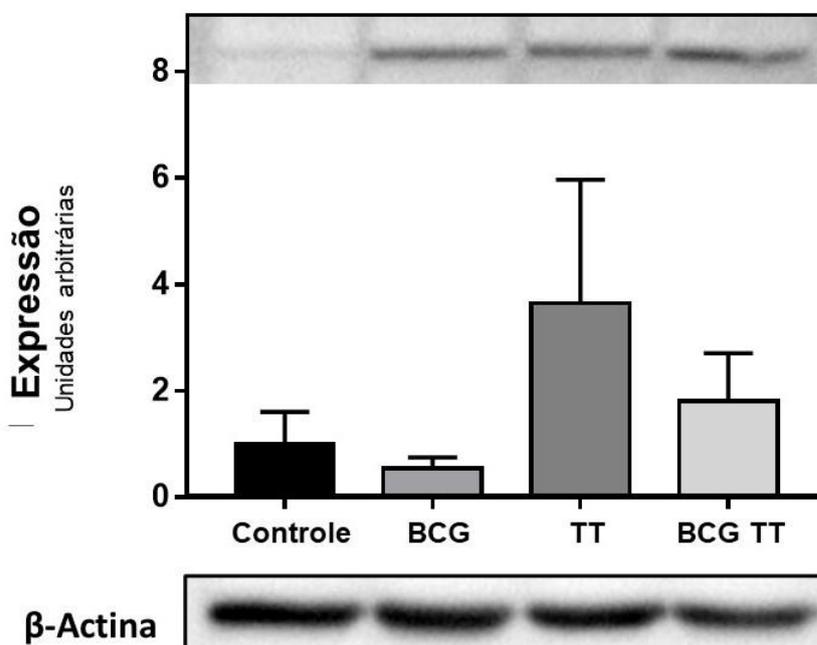


Figura 11 Análise por western blotting de bexiga com expressão de TLR2



5. DISCUSSÃO

A linhagem Fischer 344 foi usada por ter resposta fisiológica mais parecida com o humano quando induzido carcinoma de bexiga. O sexo do animal foi escolhido devido a sua facilidade de acesso a bexiga, uma vez que em ratos machos a fisiologia da uretra é em forma de S, fazendo com que a instilação dos medicamentos não seja efetiva devido aos altos índices de óbito por perfuração. A retirada dos animais foi realizada a medida que os animais eram fornecidos pelo CEMIB, o que torna a amostra não homogênea.

A solubilidade do suplemento TT é baixa em água, portanto meios de diluição foram testados. O uso do tampão bicarbonato, diluiu a amostra, porém ficavam alguns grumos o que dificultava a gavagem dos animais e sendo um ponto falho a medida em que não se sabe o quanto de suplemento foi realmente ingerido. O uso do DMSO, um solvente orgânico, foi satisfatório, porém sabe-se que altas doses pode-se tornar tóxico. O uso do mesmo foi feito na menor dose encontrada para preservar a saúde dos animais.

Nossos resultados sugerem potencial interferência favorável da suplementação de TT na limitação da carcinogênese e melhora da imunoterapia BCG intravesical, com diminuição significativa da proliferação celular (Ki-67) e angiogênese (VEGF) e tendência de aumento de TLR4 e 5, uma classe de moléculas relacionadas ao sistema ativação do sistema. Estudos anteriores mostraram uma relação direta entre a resposta terapêutica e o aumento da expressão dos TLRs, principalmente no tratamento com BCG intravesical (Ferrari et al., 2015). Porém não houve resultado significativo entre HIF e TL2, gerando assim novos questionamentos a base dessas proteínas.

O VEGF, desenvolve papel importante na neoangiogênese, e mostrou relação inversa com a resposta do câncer de bexiga tratado com BCG, uma vez que atua proliferação celular e no desenvolvimento neoplásico (Reis et al., 2010). Um achado importante no estudo foi a diminuição de VEGF com todos os tratamentos, sendo mostrado por uma redução no crescimento dos vasos o que relacionado com o controle do câncer. Um resultado importante é que o VEGF não foi potencializado

pelos aminoácidos, o que sugere que o suplemento de TT não está favorecendo a proliferação tumoral e a neo-angiogênese.

Enquanto outro estudo indica que TT induz toxicidade nas linhas de células tumorais estudadas, a associação TT mostrou um efeito significativamente melhorado. Foi demonstrado que em alguns tipos de células o triptofano e seu metabólito L-quinurenina afetam o ciclo celular e reduzem a proliferação celular, o que ativa as vias responsáveis pela morte celular programada (X. Li et al., 2019).

Glicose, aminoácidos e ácidos graxos são substratos importantes para o câncer, e desempenham um papel importante no metabolismo central. Porém, essas vias podem ser desreguladas na presença de células cancerosas, e dependem assim de fatores como proliferação celular, metabolismo do microambiente e até mesmo de resistência aos medicamentos (Platten et al., 2019).

Avanços no imunometabolismo buscam detectar nutrientes que regulam as respostas imunes ao câncer, tentando identificar como as células cancerosas são capazes de suprimir a imunidade antitumoral, depletando nutrientes essenciais como o triptofano, reduzindo sua capacidade protetora (Prieto et al., 2017).

A imunonutrição vem sendo cada vez mais estudada, uma vez que podemos entender melhor os mecanismos e assim contribuir para a melhora do sistema imunológico, modular a resposta imunológica adquirida com potencial para melhorar o prognóstico do paciente. Já é sabido que o uso de suplementação com nutrientes específicos contribui significativamente na prevenção da desnutrição em condições de doença e em pacientes pré e pós-operatórios (Philpott and Ferguson, 2004; Weimann et al., 2017). A desnutrição impacta negativamente o sistema imunológico e os aminoácidos essenciais, ácidos graxos ômega-3 e nucleotídeos são os principais compostos de sua sustentação (Elamin et al., 2016).

O triptofano é um aminoácido essencial obtido exclusivamente através do consumo alimentar, e está ligado a diversos processos fisiológicos como o crescimento e manutenção celular e seu desequilíbrio pode levar a doenças como doenças autoimunes e câncer. A degradação do triptofano livre segue duas vias, uma para a produção de neurotransmissores como a serotonina e outra, responsável

por 95% dessa degradação, é a via da quinurenina que gera metabólitos para a resposta do sistema imunológico (Elamin et al., 2016; X. Li et al., 2019).

Em cânceres, a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e as enzimas triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) estão aumentadas e estão relacionadas à progressão do tumor e ao mau prognóstico do paciente. Altos níveis dessas enzimas afetam o sistema imunológico e inibem a proliferação de células T, restringindo a infiltração imune do tumor, onde IDO induz um mecanismo contra-regulatório na resposta de citocinas. Recentemente, os inibidores dessas enzimas foram propostos como agentes terapêuticos em combinação com o ponto de controle imunológico (Platten et al., 2019; Prieto et al., 2017).

Outro composto que tem sido estudado para melhorar o prognóstico e fortalecer o sistema imunológico são os nucleotídeos. Na última década, estudos mostraram um efeito no sistema imunológico e nos tecidos relacionados ao crescimento e diferenciação. A ação dos nucleotídeos está diretamente relacionada à maturação, ativação e proliferação dos linfócitos, uma vez que eles ativam macrófagos por meio da modulação da resposta do sistema imunológico. A timina desempenha um papel importante na carcinogênese, pois produz alguns metabólitos-chave, como a timidina fosforilase (TF), que é uma enzima do metabolismo de nucleosídeos que desempenha um papel importante na via de resgate da pirimidina (Toi et al., 2005). Está associado a recuperação celular devido ao estresse patológico e manutenção das mitocôndrias (Haraguchi et al., 1994; Toi et al., 2005).

No contexto do câncer, o TF desempenha um papel importante na angiogênese, replicação e reparo do DNA, agindo como um fator antiapoptótico por meio da inibição farmacológica ou deleção genética, fazendo com que sua superexpressão esteja relacionada a um mau prognóstico (Bronckaers et al., 2009; Haraguchi et al., 1994). A expressão do TF está sendo estudada em vários tipos de câncer (Kubota et al., 1997), incluindo o carcinoma da bexiga (Aoki et al., 2006; Kim et al., 2007). Uma vez que IDO e TDO degradam o triptofano (Monteiro, 2006; Wu, 2009), e o TF degrada a timina (Aoki et al., 2006), é de grande importância compreender novos mecanismos desses componentes, e como podem interferir na

resposta terapêutica, especificamente quando envolve imunoterapia, como BCG intravesical no tratamento do câncer de bexiga.

A estratégia proposta neste estudo é baseada nessas experiências prévias de dupla interferência no metabolismo e modulação do sistema imunológico, representadas por suplementação e imunoterapia BCG intravesical. Nossa hipótese é que a suplementação tem potencial em promover a manutenção dos níveis de TT e pode representar resultados equivalentes em comparação à estratégia de inibição de enzimas de degradação.

Estudos pré-clínicos com essa associação têm mostrado resultados positivos em termos de baixa toxicidade (Monteiro, 2006) e eficácia como atividade antiulcerogênica, antiinflamatória, modulação da atividade tumoral e proteção renal (Camargo et al., 2018; PRESTES, 2010).

A suplementação de TT foi recentemente estudada com foco na fisiologia celular e fisiopatologia do câncer. O estudo atual abre um novo caminho para seu potencial imunomodulador no câncer de bexiga. O estudo tem limitações relacionadas ao fato de a titulação da dose e a caracterização da biodisponibilidade de cada composto estarem fora do escopo de análise.

No entanto, dados os resultados encorajadores, tais experimentos estão atualmente em andamento em estudos complementares de longo prazo *in vitro* e *in vivo* que podem ser planejados. Com base nos resultados presentes, podem também ser adicionados análises a longo prazo relacionados a sobrevivência.

Além disso, o foco relativamente limitado na análise de proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, TLR (s) e regulamentos VEGF, foi delineado com base em estudos seminais anteriores e moléculas-chave estratégicas (PRESTES, 2010; Reis et al., 2015).

A relação direta entre a quantificação da proteína VEGF descrita no presente estudo e a angiogênese foi previamente descrita (Camargo et al., 2018; Reis et al., 2015). Além disso, o VEGF tem sido um alvo molecular terapêutico de sucesso, pelo anticorpo monoclonal anti-VEGF (como o bevacizumabe, pazopanibe,

etc.) com significativo impacto clínico e aumento da sobrevida em diversos tipos de câncer. Em uma tendência semelhante, uma relação direta entre a quantificação de TLR e o controle do câncer urotelial foi descrita (Pili R,2013), e os agonistas de TLR (como o imiquimod) (Camargo et al., 2018) têm sido terapias bem-sucedidas contra o câncer urotelial (Ohadian Moghadam and Nowroozi, 2019).

Além disso, os experimentos in vivo são baseados em um modelo animal de NMIBC imunocompetente clinicamente significativo (Kates et al., 2017; LaRue H, Ayari C, Bergeron A, 2013) e, como tal, embora o impacto relevante na carga do tumor seja descrito, nenhuma vantagem de sobrevivência é esperada no contexto de NMIBC de curto prazo estudado. para nossos experimentos contínuos de longo prazo projetados com base em resultados promissores atuais.

6. CONCLUSÃO

A suplementação de TT apresentou potencial para limitar o crescimento do tumor urotelial e potencializar os efeitos do BCG no tratamento do câncer urotelial, reduzindo a proliferação celular e potencialmente ativando os TLRs, sem aumento da angiogênese (VEGF), abrindo novas perspectivas de imunonutrição no futuro.

7. REFERÊNCIAS

American Cancer Society. Key Statistics for Bladder Cancer 2019a. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics.html> (Acesso dia 4 de Julho, 2019).

American Cancer Society. Treating Bladder Cancer 2019b. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/treating.html> (acesso 20 de Agosto, 2019).

Aoki S, Yamada Y, Nakamura K, Taki T, Tobiume M, Honda N. Thymidine phosphorylase expression as a prognostic marker for predicting recurrence in primary superficial bladder cancer. *Oncol Rep* 2006;16:279–84.

Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 2003;85:23–33.

Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr Mol Med* 2001;1:501–13.

BÖHLE A, BRANDAU S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 2003;170:964–9. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000073852.24341.4a>.

Braga M, Sandrucci S. Perioperative nutrition in cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:751–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.02.006>.

Braga M, Wischmeyer PE, Drover J, Heyland DK. Clinical Evidence for Pharmaconutrition in Major Elective Surgery. *J Parenter Enter Nutr* 2013;37:66S-72S. <https://doi.org/10.1177/0148607113494406>.

Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Liekens S. The Dual Role of Thymidine Phosphorylase in Cancer Development and Chemotherapy. *Med Res Rev* 2009;29:903–953. <https://doi.org/DOI 10.1002/med.20159>.

Camargo JA, Passos GR, Ferrari KL, Billis A, Saad MJA, Reis LO. Intravesical Immunomodulatory Imiquimod Enhances Bacillus Calmette-Guérin Downregulation of Nonmuscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2018;16:e587–93. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.10.019>.

Cozzolino S. Nutracêuticos: o que significa. *Assoc Bras Para Estud Da Obesidade–ABESO* 2012;55.

Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426:1–10.

Elamin YY, Rafee S, Osman N, O’Byrne KJ, Gately K. Thymidine Phosphorylase in Cancer; Enemy or Friend? *Cancer Microenviron* 2016;9:33–43. <https://doi.org/10.1007/s12307-015-0173-y>.

Ferrari KL, De Camargo JA, Rocha GZ, Carnevalheira JBC, Saad MJA, Billis A, et al. Intravesical bacillus calmette-guérin efficiently reduces p70S6K1 but not 4E-BP1 phosphorylation in nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2015;193:682–9. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.08.106>.

Grohmann U, Mondanelli G, Belladonna ML, Orabona C, Pallotta MT, Iacono A, et al. Amino-acid sensing and degrading pathways in immune regulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017;35:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.05.004>.

Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, et al. Angiogenic activity of enzymes [7]. *Nature* 1994;368:198. <https://doi.org/10.1038/368198a0>.

Hébuterne X, Lemarié E, Michallet M, De Montreuil CB, Schneider SM, Goldwasser F. Prevalence of malnutrition and current use of nutrition support in patients with cancer. *J Parenter Enter Nutr* 2014;38:196–204. <https://doi.org/10.1177/0148607113502674>.

Hicks, R. M; Wakefield JS. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. *Chem Biol Interact* 1972;5:139–52.

[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(72\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(72)90040-3).

INCA. Câncer de bexiga 2017a. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>.

INCA. Imunoterapia 2017b. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga/profissional-de-saude>.

Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989;338:557–62. <https://doi.org/10.1038/338557a0>.

Karbownik M, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2000;88:7–11.

Kates M, Nirschl T, Sopko NA, Matsui H, Kochel CM, Reis LO, et al. Intravesical BCG Induces CD4+ T-cell expansion in an immune competent model of bladder cancer. *Cancer Immunol Res* 2017;5:594–603. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0267>.

keszthelyi d., troost f. j., masclée a. a. m. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:1239–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x>.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191–7. <https://doi.org/10.1038/ni1428>.

KRONING R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines 2000:43–9.

Kubota Y, Miura T, Moriyama M, Noguchi S, Matsuzaki J, Takebayashi S, et al. Thymidine phosphorylase activity in human bladder cancer: Difference between

superficial and invasive cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:973–6.

LaRue H, Ayari C, Bergeron A FY. Toll-like receptors in urothelial cells-targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol* 2013;10:37–545. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.153>.

Li M, Kwok MK, Fong SSM, Schooling CM. Indoleamine 2,3-dioxygenase and ischemic heart disease: a Mendelian Randomization study. *Sci Rep* 2019;9:8491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44819-7>.

Li X, Wenes M, Romero P, Huang SCC, Fendt SM, Ho PC. Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:425–41. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0203-7>.

Liakou CI, Narayanan S, Tang DN, Logothetis CJ, Sharma P. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immun Arch* 2007;7:10.

Luo Y, J. E, R. M, R. J, A. M. Immunotherapy of Urinary Bladder Carcinoma: BCG and Beyond. In: Rangel L, editor. *Cancer Treat. - Conv. Innov. Approaches*, InTech; 2013.

Markus CR, Firk C, Gerhardt C, Kloek J, Smolders GJF. Effect of different tryptophan sources on amino acids availability to the brain and mood in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;201:107–14. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1254-0>.

McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *J Parenter Enter Nutr* 2016;40:159–211. <https://doi.org/10.1177/0148607115621863>.

Monteiro KM. Avaliação toxicológica e farmacológica do complemento nutricional “tk3” 2006.

Morales A, Eidinger D. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol* 1976;115:377–80.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *J Exp Med* 1999;189:1363–72. <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1363>.

Nishigaki Y, Martí R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111:1913–21. <https://doi.org/10.1172/JCI17828>.

Nobel.	No	Title	2018.
--------	----	-------	-------

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>.

O'Brien TS, Fox SB, Dickinson AJ, Turley H, Westwood M, Moghaddam A, et al. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers. *Cancer Res* 1996;56:4799–804.

Ohadian Moghadam S, Nowroozi MR. Toll-like receptors: The role in bladder cancer development, progression and immunotherapy. *Scand J Immunol* 2019;90:1–21. <https://doi.org/10.1111/sji.12818>.

Passos GR, Camargo JA, Ferrari KL, Saad MJA, de Mattos AC, Reis LO. Intravesical Thalidomide boosts bacillus Calmette-Guérin (BCG) in non-muscle invasive bladder cancer treatment. *Med Oncol* 2018;35:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1067-2>.

Philpott M, Ferguson LR. Immunonutrition and cancer. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2004;551:29–42. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.03.005>.

Pili R; Qin R, Flynn PJ, Picus J, Millward M, Ho WM, Pitot H, Tan W, Miles KM, Erlichman C U. V. A phase II safety and efficacy study of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor pazopanib in patients with metastatic urothelial cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2013;11(4):477–483.

<https://doi.org/10.1016/j.clgc.2013.05.005>.

Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:379–401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>.

PRESTES JC. Estudo prospectivo, duplo-cego e randomizado, para avaliar a eficácia e a tolerabilidade do suplemento nutricional “TK3” na redução da toxicidade apresentada por pacientes em quimioterapia para diferentes tipos de câncer. Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, 2010.

Prieto I, Montemuiño S, Luna J, de Torres MV, Amaya E. The role of immunonutritional support in cancer treatment: Current evidence. *Clin Nutr* 2017;36:1457–64. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.015>.

Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11:153–62. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.15>.

Reis LO, Fávaro WJ, Ferreira U, Billis A, Fazuoli MG, Cagnon VHA. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol* 2010;28:499–505. <https://doi.org/10.1007/s00345-010-0545-3>.

Reis LO, Ferrari K, Zamuner M, Rocha GZ, Billis A, Fávaro WJ. Urothelial carcinogen resistance driven by stronger Toll-like receptor 2 (TLR2) and Uroplakin III (UP III) defense mechanisms: a new model. *World J Urol* 2015;33:413–9. <https://doi.org/10.1007/s00345-014-1329-y>.

Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VHA, Fávaro WJ. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *J Urol* 2012;187:438–45. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.10.022>.

Reis LO, Pereira TC, Favaro WJ, Cagnon VHA, Lopes-Cendes I, Ferreira U. Experimental animal model and RNA interference: A promising association for

bladder cancer research. *World J Urol* 2009;27:353–61. <https://doi.org/10.1007/s00345-009-0374-4>.

Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998;56:359–84. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00052-5).

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000;7:444–58. <https://doi.org/25480>.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.

Seager CM, Puzio-Kuter AM, Patel T, Jain S, Cordon-Cardo C, Mc Kiernan J, et al. Intravesical Delivery of Rapamycin Suppresses Tumorigenesis in a Mouse Model of Progressive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res* 2009;2:1008–14. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0169>.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:3967–3972.

Sieja K, Talerczyk M. Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2004;93:320–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.12.013>.

Sonoda T, Tatibana M. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth* 1978;521:55–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90248-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90248-4).

Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol* 2016;16:599–611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>.

TARTARI RF, BUSNELLO FM, NUNES CHA. Perfil nutricional de pacientes em tratamento quimioterápico em um ambulatório especializado em

quimioterapia. Rev Bras Cancerol 2010;56:43–50.

Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, Chow LWC. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005;6:158–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)01766-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)01766-3).

Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res* 2001;31:193–8. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.310301.x>.

Weimann A, Braga M, Carli F, Higashiguchi T, Hübner M, Klek S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in surgery. *Clin Nutr* 2017;36:623–50. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.02.013>.

Winter CG, Christensen HN. Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. *J Biol Chem* 1964;239:872–878.

Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;37:1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>.

Wynberg, JB, Linehan, M, Childs, R. Immunotherapy: Basic Guidelines. *Urol. Oncol.* 1st ed., Saunders; 2005, p. 832.

Yoshida O, Brown RR, Bryan GT. A possible role of urinary metabolites of tryptophan in the heterotopic recurrence of bladder cancer in man. *Am J Clin Nutr* 1971;24:848–51.

8. ANEXOS

8.1. Documento de aprovação de uso animal



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Impacto do suplemento nutricional TK3 na carcinogênese e tratamento do câncer de bexiga não-músculo invasivo com Bacilo Calmette-Guerin (BCG)**, registrada com o nº **4582-1/2017**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis e Marina Vian Ossick**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **27 de junho de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/08/2017-15/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/08/2017-15/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / F344/NTacUnib (Fischer 344)
No. de animais:	40
Peso / Idade:	07 semanas / 150g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

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

Campinas, 27 de junho de 2017.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

8.2. Artigo publicado

This is an Author's Original Manuscript of an article published by Taylor & Francis in Nutrition and Cancer on December, 08, 2020, available at <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2020.1856389?journalCode=hnuc20>

"This article has been accepted for publication in Nutrition and Cancer, published by Taylor & Francis

CARCINOGENESIS AND BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG) INTRAVESICAL TREATMENT OF NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER UNDER TRYPTOPHAN AND THYMINE SUPPLEMENTATION

Marina V. Ossick¹; Heloisa B. Assalin¹, Isis G.A. Kiehl¹; Ana C.C. Salustiano¹; Guilherme Zweig Rocha¹; Karen L. Ferrari¹; Maria C.B. Linarelli²; Giovanna Degasperi²; Leonardo O. Reis^{1,2}

¹UroScience, School of Medical Sciences, University of Campinas,
Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

²Pontifical Catholic University of Campinas, PUC-Campinas, São Paulo,
Brazil

Word count: 200 / 2466

Correspondence to:

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis, MD, MSc, PhD

Livre Docente Urologia

UroScience

Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas)

R. John Boyd Dunlop, s/n

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

E-mail:

reisleo.l@gmail.com

Abstract

Purpose: Evaluate tryptophan and thymine (TT) impact on carcinogenesis and intravesical BCG bladder cancer treatment.

Methods: After identification of tryptophan plus thymine *in vitro* inhibitory effect in multiple cancer cell cultures, bladder cancer animal model was induced by MNU intravesical instillations and randomized into 4 groups: Control (n = 9), BCG (n = 9), TT (n = 7) and BCG + TT (n = 8). BCG groups received intravesical 10^6 CFU BCG in 0.2 ml saline for 6 consecutive weeks and TT groups received 1g/kg (1:1) of TT via daily gavage. After 15 weeks of protocol, animals were euthanized and the urinary bladders submitted to histopathology, immunohistochemistry, and Western blotting.

Results: Urothelial cancer was identified in 100%, 85.7%, 44.5% and 37.5% of Control, TT, BCG and BCG+TT groups, respectively. Cell proliferation marked by nuclear Ki-67 was higher in the Control compared to animals in the other groups (p 0.03). BCG, TT and BCG+TT groups showed proliferative cell decline and TLR4/5 labeling increase in the urothelium. BCG decreased the urothelial VEGF labeling, even in TT association.

Conclusion: Tryptophan and thymine inhibit urothelial carcinogenesis and potentiate the intravesical BCG in the treatment of bladder cancer by reducing cell proliferation and activating TLRs.

Key words: urinary bladder cancer; bacillus Calmette-Guérin; tryptophan; thymine; supplement; immunonutrition

Introduction

According to the American Cancer Society, 80,470 new cases of bladder cancer are estimated in 2019, the incidence in men are declining although death numbers remained stable. Most cases when discovered are characterized as non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC), and only 1 in 3 cases spread to deeper layers(American Cancer Society, 2019a).

Cancer treatments can be divided into surgery, radiotherapy, chemotherapy and immunological treatment, but the choice of treatment depends on the disease stage and grade. Immunotherapeutic treatment with bacillus Calmette-Guérin (BCG) after transurethral resection (TUR) has been effective in NMIBC, but some patients are refractory to this treatment and eventually develop muscle invasive disease (MIBC) due to cell proliferation processes(American Cancer Society, 2019b).

While there are numerous examples of beneficial effects of amino acids and micronutrients given as nutritional supplements in the prevention, evolution and adjunctive treatment of various conditions(Braga et al., 2013; Hébuterne et al., 2014; Weimann et al., 2017), the use of nutritional supplements in cancer patients is somehow controversial due to divergences about their benefits and whether or not they might represent a source of substrate for neoplastic cells.

Tryptophan is an essential amino acid involved in various physiological processes, representing only 2% of the metabolic pathway. Most of the tryptophan is used in protein synthesis, where its major metabolic pathway is kynurenine, involved in the immune system modulation. A recent study showed that tryptophan-treated rats showed higher phagocytic activity and reduced oxidative metabolism, in addition to participating in the immune system activating T lymphocyte (Luo et al., 2013; Tryptophan, 1985).

Thymine is a nitrogenous base of the group of pyrimidines, which are constantly being formed within cells. Animal studies have shown that ingestion of nitrogenous bases is directly linked to protein synthesis, and is related to increased longevity, but studies in humans are still scarce (Sonoda and Tatibana, 1978).

Thus, the present study evaluated the impact of tryptophan and thymine supplementation on carcinogenesis and BCG treatment of NMIBC in a clinically relevant immunocompetent animal model.

Materials and methods

Cell culture

Diverse cell cultures including breast carcinoma (MC7), colon (HT29), prostate (PC3) and leukemia cells (K562), were challenged with thymine, tryptophan, and association (TT). Cell viability was evaluated at every 12 hours up to 48 hours in a Neubauer chamber with optical microscopy. Cell death analysis was performed using annexin-V and propidium iodide. A total of 1×10^6 cells/ml were kept for up to 48

hours in RPMI 1640 medium supplemented with bovine fetal serum 10% and 1 µg/ml gentamicin at 37°C and 5% CO₂. Apoptosis and necrosis were determined by flow cytometry.

Tumor induction, treatment and tissue harvest

After ethics committee on animals use approval (protocol no 4582-1/2017), female Fisher344 rats were used at 7 weeks of age, weighing approximately 150 to 200 g. Animals were randomized in 4 groups: Control (n=9), BCG (n=9), TT (n=7) and BCG+TT (n=8).

For bladder cancer induction all animals were anesthetized with 2% Xylazine Hydrochloride (5mg/kg IP; König, Sao Paulo, Brazil) and 10% Ketamine Hydrochloride (60mg/kg IP; Fort Dodge, Iowa, USA) and maintained in this state for 45 minutes to prevent spontaneous urination and an intravesical N-methyl-N-nitrosourea (MNU - Sigma, St. Louis, MO, USA)(Reis et al., 2010) dose of 1.5 mg/kg dissolved in 0.2 mL of saline solution every 15 days (on week 0, 2, 4 and 6) totaling 4 doses was instilled(Reis et al., 2012).

TT and BCG+TT groups received the supplement TT, 7% vehicle solution of dimethylsulfoxide (DMSO) by orogastric gavage, in a single daily dose of 1g/kg body weight/day and 1% of its body weight volume during all protocol (from weeks 1 to 15). Control and BCG groups received same gavage protocol without TT.

BCG and BCG+TT groups received an intravesical dose of 10⁶ CFU BCG (*Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil*) diluted in 0.2 ml saline for 6

consecutive weeks (once a week, from weeks 8 to 13)(Reis et al., 2012). Control and TT groups received same intravesical protocol without BCG.

All animals received ad libitum water and the same solid diet (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). At the end of the protocol (week 15), the animals were euthanized ensuring the loss of muscle reflexes with an overdose of Sodium Tiopental anesthetic (Cristália, São Paulo, Brazil) 40 mg/kg diluted in 0.9% saline solution. The bladders were retained and sectioned in two sagittal sections and randomized to histopathology/immunohistochemistry and western blotting.

Histopathology and Immunohistochemistry

Half bladders sagittal sections were paraffin included and cut in 5µm slides for histopathology and immunohistochemistry.

- Histopathology

After hematoxylin/eosin staining, slides were graded by a trained pathologist using the World Health Organization consensus on bladder cancer staging.

- Proliferative assay: Ki-67

The same bladder slides were immersed in 0.3% H₂O₂ and in blocking solution at room temperature. We used primary rabbit polyclonal anti-Ki-67 (AB9260, Millipore, Massachusetts, USA), diluted in 1% bovine serum albumin (BSA) applied to the sections overnight at 4°C. Bound antibody was detected with Envision HRP kit (DakoCytomation Inc., Carpinteria, California, USA), during 40 min at room

temperature. Sections were counterstained with Harris hematoxylin and photographed with Zeiss Axio Imager A2 photomicroscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). The images were taken with 40x magnification. Cellular proliferation index was determined by the ratio of number of Ki-67-positive nuclei by the total number of urothelial cell nuclei in the microscope field (Ferrari et al., 2015; Reis et al., 2012).

Immunoblotting

Bladders were homogenized in extraction buffer (100mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane pH7.4, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0,1mg/ml aprotinin and 10% Triton-X 100) using TissueLyser II (QiagenR, USA). Samples were centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 40 minutes and the supernatant proteins were quantified using the Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich) at the Synergy HT Microplate Reader (BioTek).

The samples were prepared for eletrophoresis with Laemmli buffer containing 100mM dithiothreitol and heated at 100°C for 5 minutes. Aliquots containing 60ug protein were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% to 15% polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific protein binding was reduced by incubating the membrane for 1 hour at ambient temperature in blocking buffer (5% bovine serum albumin (BSA), 10mM Tris, 150mM NaCl and 0,02% Tween 20).

Membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted 1:1000 in 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0,02% Tween 20, under constant agitation: TLR4, TLR5 and VEGF (SC-30002, SC-30003, SC-507 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) and β -actin (4967 Cell Signalling Rabbit). The membranes were then incubated for 1.5 hours with anti- rabbit secondary antibody (Pierce goat anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated, Thermo Scientific) diluted 1:5000 in 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0,02% Tween 20.

Immunoreactive bands were detected using the chemiluminescence method (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) in Imager XRS Gel Doc BioRad (California, USA) and band intensities were quantified by densitometry through the Image Lab Software v.6.0.1 (BioRad). β -actin was used as endogenous control. The results were expressed as means between the bands compared to the intensity of β -actin labeling.

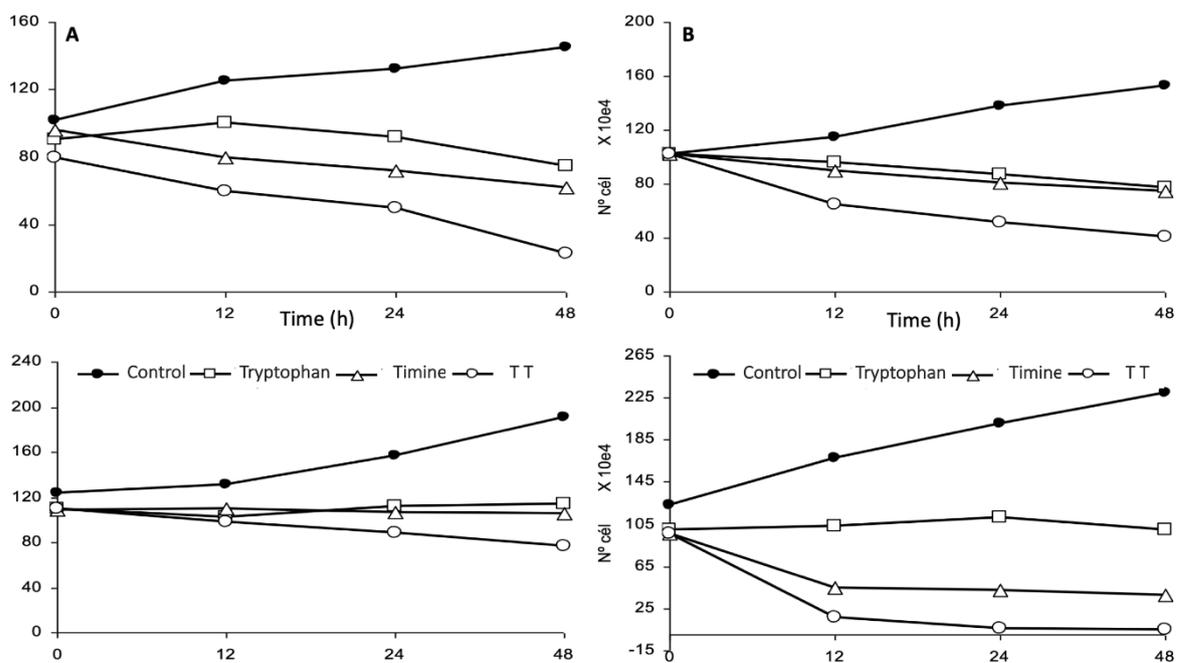
Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate, and data were analyzed and featured as mean \pm SD (standard derivation). We used ANOVA statistical test to analyze the differences between groups and Bonferroni post hoc test for multiple un-pairwise comparisons of means. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

Results

Cell culture

After incubation with TT, the cells presented significant growth reduction ($p < 0.01$) when compared to controls, while isolated thymine and tryptophan showed lower effect, even after 48 hours of incubation for all cell types, indicating that greater effects occur with the combination of the two compounds (**Figure 1**). Activation of programmed cell death predominated in all cell lines (data not shown).



Histopathology

Table 1 shows complete histopathological stage and grade classifications by group. A clear trend to carcinogenesis limitation was observed with 100% and 85.7% of urothelial cancer found in Control and TT supplemented groups, respectively. And BCG optimization with 44.5% and 37.5% residual tumors identified in BCG and BCG+TT supplementation groups, respectively.

Table 1: Bladder histopathological stage and grade classification by group

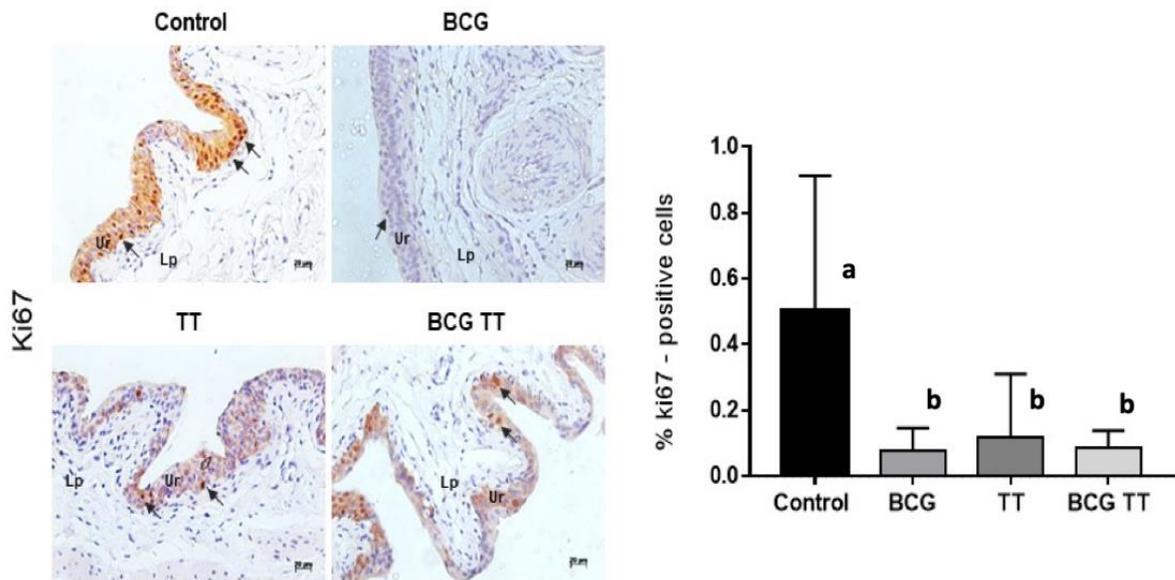
Histopathology	Control	TT	BCG	BCG-TT
	=9	=7	=9	=8
Normal / Hyperplasia			2.2%	37.5%
Low-grade Intraepithelial Neoplasia		14.3%	3.3%	25.0%
Papillary (pTa)	44.4%	28.6%	2.2%	25.0%

Low-Grade				
<i>In situ</i>				
High-Grade (pTis)	22.2%	28.6%	2.2%	12.5%
Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (pT1)				
	33.3%	28.6%		
High-Grade				

Any urothelial cancer	100%	85.7%	4.5%	37.5%
----------------------------------	-------------	--------------	-------------	--------------

Proliferative index

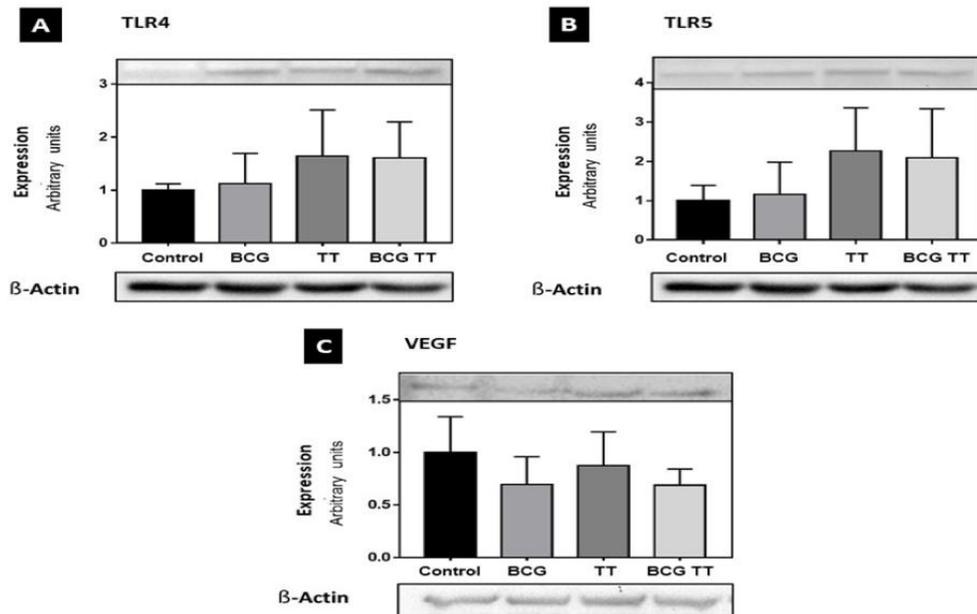
The proliferative index, marked by Ki-67, was higher in the control group compared to animals in the other groups ($p=0.03$). The BCG, TT and BCG+TT groups showed similar proliferative cell decline compared to the Control group (**Figure 2**).

Figure 2: Proliferative index

Immunoblotting quantification of TLR4, TLR5 and VEGF

Analysis of TLR4 protein in bladder samples showed up-regulation in the groups containing tryptophan and thymine alone and associated with BCG (**Figure 3A**). The same happened with the TLR5 protein (**Figure 3B**).

BCG-treated groups also up-regulated TLR4/5 (**Figures 3B/C**) and down-regulated VEGF protein (**Figure 3C**) alone and associated with TT.

Figure 3: Immunoblotting quantification of TLR4, TLR5 and VEGF

Discussion

Our results suggest potential favorable interference of tryptophan and thymine supplementation in the carcinogenesis limitation and improvement of intravesical BCG immunotherapy, with significant decrease in cell proliferation (ki-67) and angiogenesis (VEGF) and a trend to increase TLRs, a class of molecules related to immune system activation. Previous studies have shown a direct relationship between therapeutic response and TLRs increased expression, mainly in the intravesical BCG treatment^{12,13}.

Cell proliferation and neoplastic development depend on neo-angiogenesis, which is importantly promoted by VEGF, that showed an inverse relationship with BCG-treated bladder cancer resolution(Reis et al., 2012). The decrease in VEGF with all of the treatments, which may indicate a reduction in vessel growth, is an important

finding and is related to cancer control. An important result is that VEGF was not enhanced by the amino acids, which suggests that TT supplement is not favoring tumor proliferation and neo-angiogenesis.

While our results indicate that both tryptophan and thymine induce toxicity in the tumor cell lines herein studied, the TT association showed a significantly improved effect. It has been shown that in some cell types tryptophan and its metabolite I-Kynurenine affect the cell cycle and reduce cell proliferation, which activates the pathways responsible for programmed cell death¹⁴.

Cancer, like its rival immune system, relies on common substrates to develop: glucose, amino acids and fatty acids, which play an important role in central metabolism. But the central metabolic pathways can be deregulated in the cancer cell, depending on factors such as microenvironment metabolism, cell proliferation fine tune and even drug resistance mechanisms¹⁵.

Advances in immunometabolism attempt to detect nutrients that regulate immune responses to cancer, trying to identify how cancer cells are able to suppress antitumor immunity, thus depleting essential nutrients such as tryptophan, reducing their protective capacity(Platten et al., 2019).

Studies are conducted to better understand how immunonutrition can contribute to immune system improvement, modulate acquired immune response with potential to improve patient prognosis. The use of specific nutrients supplementation contributes significantly to the prevention of malnutrition in disease conditions and in pre- and post-operative patients(Philpott and Ferguson, 2004; Weimann et al., 2017). Malnutrition negatively impacts the immune system and

essential amino acids, omega 3 and nucleotides are the main compounds for its support¹⁸.

Tryptophan is an essential amino acid that is obtained exclusively through food consumption, and is linked to various physiological processes such as cell growth and maintenance and its imbalance can lead to conditions such as autoimmune diseases and cancer. Free tryptophan degradation follows two pathways, one for producing neurotransmitters such as serotonin and another, which accounts for 95% of this degradation, is the kynurenine pathway that generates metabolites for immune system response¹⁴⁻¹⁸.

In cancers, the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) enzymes are increased and are related to tumor progression and patient poor prognosis. High levels of these enzymes affect the immune system and inhibit T cell proliferation, restricting tumor immune infiltration, where IDO induces a counter-regulatory mechanism in cytokine response. Recently, inhibitors of these enzymes have been proposed as therapeutic agents in combination with immune-checkpoint inhibitors(X. Li et al., 2019; Platten et al., 2019).

Another compound that has been studied to improve prognosis and strengthen the immune system are nucleotides, which are compounds derived from purine or pyrimidine. In the last decade, studies have shown an effect on the immune system and on tissue growth and differentiation. Nucleotide action is directly related to lymphocyte maturation, activation and proliferation as they activate macrophages by modulating the immune system response(Prieto et al., 2017).

Thymine plays an important role in carcinogenesis as it produces some key metabolites, such as thymidine phosphorylase (TF), which is a nucleoside metabolism enzyme that plays an important role in the pyrimidine rescue pathway(Elamin et al., 2016). It is associated with cellular recovery due to pathological stress and maintenance of mitochondria(Elamin et al., 2016; Toi et al., 2005).

In the cancer context, TF plays an important role in angiogenesis, replication and DNA repair, acting as an antiapoptotic factor through pharmacological inhibition or genetic deletion, causing its overexpression to be related to a poor prognosis(Haraguchi et al., 1994; Ishikawa et al., 1989; Nishigaki et al., 2003; Toi et al., 2005). The expression of TF is being studied in several types of cancer(Bronckaers et al., 2009), including bladder carcinoma(Aoki et al., 2006; Kubota et al., 1997; O'Brien et al., 1996).

Since IDO and TDO degrade tryptophan(Grohmann et al., 2017; Speiser et al., 2016), and TF degrades thymine (Kubota et al., 1997), it is of great importance to understand new mechanisms of these components, and how they may interfere with the therapeutic response, specifically when it involves immunotherapy, such as intravesical BCG in bladder cancer treatment.

The strategy proposed in this study is based on these previous experiences of double interference in metabolism and modulation of the immune system, represented by supplementation and intravesical BCG immunotherapy. We hypothesize that supplementation has potential in promoting the maintenance of

tryptophan and thymine levels and might represent equivalent results compared to the inhibition of degradation enzymes strategy.

Preclinical studies using this association have shown positive results in terms of low toxicity (Monteiro, 2006) and efficacy as antiulcerogenic, anti-inflammatory activities, tumor activity modulation and renal protection (Monteiro, 2006; PRESTES, 2010).

The tryptophan and thymine supplementation have been recently studied with focus on cell physiology and cancer physiopathology. Current study opens a new road to its immunomodulatory potential in bladder cancer.

The study has limitations related to the fact that the dose titration and characterization of bioavailability of each compound was beyond the analysis scope. However, given the encouraging results, such experiments are currently underway in complementary long-term *in vitro* and *in vivo* studies that could be designed based on the present results, adding long-term and survival analysis. Also, the relatively limited focus on *in vitro* and *in vivo* cell proliferation analysis, TLR(s) and VEGF regulations, was delineated based on previous seminal studies and strategic key molecules (Camargo et al., 2018; Monteiro, 2006; Passos et al., 2018).

The direct relation between VEGF protein quantification described in the present study and angiogenesis was previously described^{32,33}. Additionally, VEGF has been a successful therapeutic molecular target, by the anti-VEGF monoclonal antibody (such as bevacizumab, pazopanib, etc.) with significant clinical impact and survival enhancement in diverse cancers³⁴. In a similar trend, a direct relation between TLR quantification and urothelial cancer control has been described³⁵, and

TLR agonists (such as imiquimod)³⁰ have been successful therapies against urothelial cancer³⁶.

Moreover, the *in vivo* experiments are based on a clinically significant immunocompetent NMIBC animal model^{37,38}, and as such, while relevant impact on tumor burden is described, no survival advantage is expected in the studied short-term NMIBC context, room for our ongoing long-term experiments designed based on current promising results.

Conclusions

Tryptophan and thymine supplementation demonstrated potential to limit urothelial carcinogenesis and to potentiate the effects of intravesical BCG in the treatment of bladder cancer by reducing cell proliferation and potentially activating TLRs, without angiogenesis (VEGF) increase, thus opening new immunonutrition perspectives in the future.

ACKNOWLEDGMENT

To the involved institutions and to Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) of UNICAMP, for the tumor cell lines.

CONFLICT OF INTERESTS

None declared

ETHICS COMMITTEE APPROVAL NUMBER

4582-1/2017

FUNDING

CNPq Research Productivity, Brazil - grant: 304747/2018-1 (Reis LO)

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MVO and GD: Data collection, data analysis, manuscript writing

HBA, IGAK, ACCS, GZR, KLF, and MCBL: Data analysis, manuscript editing

LOR: Study design, fund acquisition, data analysis, manuscript writing, supervision

References

American Cancer Society. Key Statistics for Bladder Cancer 2019a. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics.html> (accessed July 4, 2019).

American Cancer Society. Treating Bladder Cancer 2019b. <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/treating.html> (accessed August 20, 2019).

American Cancer Society. About bladder cancer 2017.

Aoki S, Yamada Y, Nakamura K, Taki T, Tobiume M, Honda N. Thymidine phosphorylase expression as a prognostic marker for predicting recurrence in primary superficial bladder cancer. *Oncol Rep* 2006;16:279–84.

Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 2003;85:23–33.

Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr Mol Med* 2001;1:501–13.

BÖHLE A, BRANDAU S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. *J Urol* 2003;170:964–9. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000073852.24341.4a>.

Braga M, Sandrucci S. Perioperative nutrition in cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:751–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.02.006>.

Braga M, Wischmeyer PE, Drover J, Heyland DK. Clinical Evidence for Pharmaconutrition in Major Elective Surgery. *J Parenter Enter Nutr* 2013;37:66S-72S. <https://doi.org/10.1177/0148607113494406>.

Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Liekens S. The Dual Role of Thymidine Phosphorylase in Cancer Development and Chemotherapy. *Med Res Rev* 2009;29:903--953. <https://doi.org/DOI 10.1002/med.20159>.

Camargo JA, Passos GR, Ferrari KL, Billis A, Saad MJA, Reis LO. Intravesical Immunomodulatory Imiquimod Enhances Bacillus Calmette-Guérin Downregulation of Nonmuscle-invasive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2018;16:e587–93. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.10.019>.

Cozzolino S. Nutracêuticos: o que significa. *Assoc Bras Para Estud Da Obesidade–ABESO* 2012;55.

Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426:1–10.

Elamin YY, Rafee S, Osman N, O'Byrne KJ, Gately K. Thymidine Phosphorylase in Cancer; Enemy or Friend? *Cancer Microenviron* 2016;9:33–43. <https://doi.org/10.1007/s12307-015-0173-y>.

Ferrari KL, De Camargo JA, Rocha GZ, Carnevalheira JBC, Saad MJA, Billis A, et al. Intravesical bacillus calmette-guérin efficiently reduces p70S6K1 but not 4E-

BP1 phosphorylation in nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2015;193:682–9.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.08.106>.

Grohmann U, Mondanelli G, Belladonna ML, Orabona C, Pallotta MT, Iacono A, et al. Amino-acid sensing and degrading pathways in immune regulation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017;35:37–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.05.004>.

Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, et al. Angiogenic activity of enzymes [7]. *Nature* 1994;368:198.
<https://doi.org/10.1038/368198a0>.

Hébuterne X, Lemarié E, Michallet M, De Montreuil CB, Schneider SM, Goldwasser F. Prevalence of malnutrition and current use of nutrition support in patients with cancer. *J Parenter Enter Nutr* 2014;38:196–204.
<https://doi.org/10.1177/0148607113502674>.

Hicks, R. M; Wakefield JS. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. *Chem Biol Interact* 1972;5:139–52.
[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(72\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(72)90040-3).

INCA. Câncer de bexiga 2017a. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>.

INCA. Imunoterapia 2017b. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga/profissional-de-saude>.

Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K,

et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989;338:557–62. <https://doi.org/10.1038/338557a0>.

Karbownik M, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2000;88:7–11.

Kates M, Nirschl T, Sopko NA, Matsui H, Kochel CM, Reis LO, et al. Intravesical BCG Induces CD4+ T-cell expansion in an immune competent model of bladder cancer. *Cancer Immunol Res* 2017;5:594–603. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0267>.

keszthelyi d., troost f. j., masclée a. a. m. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:1239–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01370.x>.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 2007;8:191–7. <https://doi.org/10.1038/ni1428>.

KRONING R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines 2000:43–9.

Kubota Y, Miura T, Moriyama M, Noguchi S, Matsuzaki J, Takebayashi S, et al. Thymidine phosphorylase activity in human bladder cancer: Difference between superficial and invasive cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:973–6.

LaRue H, Ayari C, Bergeron A FY. Toll-like receptors in urothelial cells-targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol* 2013;10:37–545. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.153>.

Li M, Kwok MK, Fong SSM, Schooling CM. Indoleamine 2,3-dioxygenase and ischemic heart disease: a Mendelian Randomization study. *Sci Rep* 2019;9:8491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44819-7>.

Li X, Wenes M, Romero P, Huang SCC, Fendt SM, Ho PC. Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:425–41. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0203-7>.

Liakou CI, Narayanan S, Tang DN, Logothetis CJ, Sharma P. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immun Arch* 2007;7:10.

Luo Y, J. E, R. M, R. J, A. M. Immunotherapy of Urinary Bladder Carcinoma: BCG and Beyond. In: Rangel L, editor. *Cancer Treat. - Conv. Innov. Approaches*, InTech; 2013.

Markus CR, Firk C, Gerhardt C, Kloek J, Smolders GJF. Effect of different tryptophan sources on amino acids availability to the brain and mood in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;201:107–14. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1254-0>.

McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, Warren MM, Johnson DR, Braunschweig C, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine

(SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *J Parenter Enter Nutr* 2016;40:159–211. <https://doi.org/10.1177/0148607115621863>.

Monteiro KM. Avaliação toxicológica e farmacológica do complemento nutricional “tk3” 2006.

Morales A, Eidinger D. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol* 1976;115:377–80.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism. *J Exp Med* 1999;189:1363–72. <https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1363>.

Nishigaki Y, Martí R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 2003;111:1913–21. <https://doi.org/10.1172/JCI17828>.

Nobel.	No	Title	2018.
--------	----	-------	-------

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary/>.

O’Brien TS, Fox SB, Dickinson AJ, Turley H, Westwood M, Moghaddam A, et al. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers. *Cancer Res* 1996;56:4799–804.

Ohadian Moghaddam S, Nowroozi MR. Toll-like receptors: The role in bladder cancer development, progression and immunotherapy. *Scand J Immunol* 2019;90:1–21. <https://doi.org/10.1111/sji.12818>.

Passos GR, Camargo JA, Ferrari KL, Saad MJA, de Mattos AC, Reis LO. Intravesical Thalidomide boosts bacillus Calmette-Guérin (BCG) in non-muscle invasive bladder cancer treatment. *Med Oncol* 2018;35:1–8. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1067-2>.

Philpott M, Ferguson LR. Immunonutrition and cancer. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2004;551:29–42. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.03.005>.

Pili R; Qin R, Flynn PJ, Picus J, Millward M, Ho WM, Pitot H, Tan W, Miles KM, Erlichman C U. V. A phase II safety and efficacy study of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor pazopanib in patients with metastatic urothelial cancer. *Clin Genitourin Cancer* 2013;11(4):477–483. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2013.05.005>.

Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:379–401. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0016-5>.

PRESTES JC. Estudo prospectivo, duplo-cego e randomizado, para avaliar a eficácia e a tolerabilidade do suplemento nutricional “TK3” na redução da toxicidade apresentada por pacientes em quimioterapia para diferentes tipos de câncer. Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, 2010.

Prieto I, Montemuiño S, Luna J, de Torres MV, Amaya E. The role of immunonutritional support in cancer treatment: Current evidence. *Clin Nutr*

2017;36:1457–64. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.015>.

Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11:153–62. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.15>.

Reis LO, Fávaro WJ, Ferreira U, Billis A, Fazuoli MG, Cagnon VHA. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol* 2010;28:499–505. <https://doi.org/10.1007/s00345-010-0545-3>.

Reis LO, Ferrari K, Zamuner M, Rocha GZ, Billis A, Fávaro WJ. Urothelial carcinogen resistance driven by stronger Toll-like receptor 2 (TLR2) and Uroplakin III (UP III) defense mechanisms: a new model. *World J Urol* 2015;33:413–9. <https://doi.org/10.1007/s00345-014-1329-y>.

Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VHA, Fávaro WJ. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *J Urol* 2012;187:438–45. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.10.022>.

Reis LO, Pereira TC, Favaro WJ, Cagnon VHA, Lopes-Cendes I, Ferreira U. Experimental animal model and RNA interference: A promising association for bladder cancer research. *World J Urol* 2009;27:353–61. <https://doi.org/10.1007/s00345-009-0374-4>.

Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998;56:359–84. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00052-5).

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000;7:444–58. <https://doi.org/25480>.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.

Seager CM, Puzio-Kuter AM, Patel T, Jain S, Cordon-Cardo C, McKiernan J, et al. Intravesical Delivery of Rapamycin Suppresses Tumorigenesis in a Mouse Model of Progressive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res* 2009;2:1008–14. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0169>.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:3967–3972.

Sieja K, Talerczyk M. Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2004;93:320–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.12.013>.

Sonoda T, Tatibana M. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth* 1978;521:55–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90248-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90248-4).

Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol* 2016;16:599–611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>.

TARTARI RF, BUSNELLO FM, NUNES CHA. Perfil nutricional de

pacientes em tratamento quimioterápico em um ambulatório especializado em quimioterapia. *Rev Bras Cancerol* 2010;56:43–50.

Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, Chow LWC. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005;6:158–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)01766-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)01766-3).

Tryptophan. 1985.

Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res* 2001;31:193–8. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2001.310301.x>.

Weimann A, Braga M, Carli F, Higashiguchi T, Hübner M, Klek S, et al. ESPEN guideline: Clinical nutrition in surgery. *Clin Nutr* 2017;36:623–50. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.02.013>.

Winter CG, Christensen HN. Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. *J Biol Chem* 1964;239:872–878.

Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;37:1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>.

Wynberg, JB, Linehan, M, Childs, R. Immunotherapy: Basic Guidelines. *Urol. Oncol.* 1st ed., Saunders; 2005, p. 832.

Yoshida O, Brown RR, Bryan GT. A possible role of urinary metabolites of tryptophan in the heterotopic recurrence of bladder cancer in man. *Am J Clin Nutr* 1971;24:848–51.