

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

JHONNE PEDRO PEDOTT SANTANA

EFICÁCIA DA INSTILAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MB49 E GEL
POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL NA IMUNIZAÇÃO CONTRA O
CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

São Carlos - SP
2020

JHONNE PEDRO PEDOTT SANTANA

EFICÁCIA DA INSTILAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MB49 E GEL
POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL NA IMUNIZAÇÃO CONTRA O
CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

São Carlos - SP
2020

Santana, Jhonne Pedro Pedott

Eficácia da instilação de células da linhagem MB49 e gel polimérico termorreversível na imunização contra o carcinoma urotelial de bexiga / Jhonne Pedro Pedott Santana -- 2020.
155f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Ricardo Carneiro Borra
Banca Examinadora: Ricardo Carneiro Borra, Fernanda de Freitas Anibal, José Tadeu Nunes Tamanini, Bianca Baccili Zanotto Vigna, Paula Cristina de Souza Souto
Bibliografia

1. Câncer de bexiga. 2. Imunização. 3. Mortalina. I. Santana, Jhonne Pedro Pedott. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Jhonne Pedro Pedott Santana, realizada em 24/09/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. José Tadeu Nunes Tamanini (UFSCar)

Profa. Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna (EMBRAPA)

Profa. Dra. Paula Cristina de Souza Souto (UFMT)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico esta tese à pessoa que eu mais admiro, que sempre apoia os meus sonhos e que está ao meu lado todos os dias. À minha amada Naiane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de antemão a todos que de alguma maneira passaram pela minha vida, no âmbito pessoal ou acadêmico, e contribuíram para a construção de quem sou hoje, mais de 10 anos após ter iniciado essa jornada em busca de conhecimento e de um sonho.

Aos meus pais, João e Luci, pelo amor incondicional, ensinamentos e por permitirem que eu pudesse me dedicar todos esses últimos anos ao estudo. Amo muito vocês.

Ao amor da minha vida, Naiane, por todo o amor, carinho, paciência, apoio emocional, paciência, por estar ao meu lado em todos os momentos de felicidade e de dificuldade, e é claro, por toda a paciência.

Aos meus irmãos, Cacio, Laura, Mariana e Rubian, por todos os momentos de alegria e lições de vida.

À família que a vida me deu, Antonia e Charles, por todo amor e incentivo a continuar buscando meus sonhos.

À querida Rafaela, que adotei já barbada e é responsável pelos meus primeiros fios brancos, por todos os presentes. Gosto muito de você.

Ao amigo de toda uma vida, Joelson, já são tantos momentos vividos, tantos momentos de descontração e felicidade. Obrigado por ser meu amigo.

Ao amigo mais velho que tenho, Pablo, por estar sempre presente me dando bons conselhos e longas conversas filosóficas.

Aos amigos Naiana e Thiago, por todo apoio aqui em São Carlos, e por sempre terem uma palavra de ânimo e confiança para compartilhar.

Aos meus amigos João Pedro e Tatiele, que compartilharam comigo essa fase difícil de pós-graduação e mesmo assim possibilitaram ótimos momentos de alegria.

Ao meu amigo de escola, Alessandro, por todos os momentos inesquecíveis de felicidade e sincera amizade, na época em que nossa única preocupação era a hora de jogar bola.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Ana Carolina, David e Thaiane, por todo companheirismo e ajuda em diversos momentos no desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas meninas do Projeto *Zebrafish*, Helena, Hirla e Tatiana, por toda amizade e companheirismo diário de laboratório.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Borra, por todos os ensinamentos, por ser sempre muito presente, atencioso, amigo, enfim, por toda orientação prestada para a realização e conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Luciana Leite, do Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan, pela parceria firmada com nosso Laboratório por meio do projeto temático de auxílio à pesquisa.

À Profa. Dra. Fernanda Anibal, do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, pela autorização a utilização do biotério do DMP, durante todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Felipe Teixeira e todos pesquisadores do Laboratório de Bioquímica Celular, principalmente ao Caio, por sempre permitir a utilização dos equipamentos e pela ajuda durante os experimentos de análise proteica.

À Profa. Dra. Priscyla Gaspari e demais pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia da FCFRP-USP, pelo preparo e fornecimento do gel polimérico termorreversível utilizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Heloisa Araújo e à Dra. Wanessa Altei, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, pela autorização, disponibilidade e ajuda na utilização do equipamento ImageXpress durante os ensaios de fluorescência.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Eduardo Leonardecz, que me guiou durante o mestrado, e Profa. Dra. Paula Souto, minha professora de graduação e orientadora de iniciação científica, por todos os conselhos e ensinamentos.

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

"Talvez não seja tarde demais para aprender a amar e esquecer como odiar."

John M. Osbourne

RESUMO

EFICÁCIA DA INSTILAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MB49 E GEL POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL NA IMUNIZAÇÃO CONTRA O CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

Dentre os diversos tipos de neoplasias malignas, as que se originam na bexiga podem ser consideradas altamente impactantes em função da sua prevalência e dos altos índices de recorrência, demonstrando a importância dos estudos envolvendo novas possibilidades terapêuticas. A linhagem celular MB49 é uma das mais utilizadas para o estudo do câncer de bexiga, por meio de sua implantação vesical em modelos murinos de indução tumoral. Estudos têm demonstrado que as proteínas de choque térmico, como a mortalina, são vitais para a resistência ao tratamento de neoplasias e estão presentes em todos os processos associados com a carcinogênese. No entanto, ainda não existem muitos estudos voltados para a utilização da mortalina como alvo terapêutico no carcinoma urotelial de bexiga. As proteínas do choque térmico também são conhecidas por desempenharem um importante papel como mediadoras da imunogenicidade. A ativação do sistema imunológico para benefício terapêutico é uma meta na imunologia há muito tempo, especialmente no tratamento do câncer. A imunoterapia antitumoral é um tratamento promissor contra diversos tipos de cânceres, porém a baixa imunogenicidade das vacinas continua a ser um fator limitante nesta área. Assim, pesquisas envolvendo a investigação da associação dessas vacinas com adjuvantes imunogênicos, como a quitosana, são de grande relevância para o estudo do câncer. Esta tese tem por objetivos: a avaliação do padrão de expressão proteica da mortalina em tecidos vesicais tumorais, por meio de ensaio de *western blot*; a investigação dos efeitos de sua inibição com MKT-077 nos índices de viabilidade, apoptose e necrose de células MB49, através de ensaios de viabilidade com resazurina e fluorescência; o estabelecimento de um novo modelo murino para a indução do carcinoma urotelial de bexiga utilizando um gel polimérico termorreversível (TPG), composto por quitosana e poloxamer; e a identificação da indução de resposta imune sistêmica antitumoral, por meio de ensaio de citotoxicidade de esplenócitos, após inoculação intravesical do TPG e células MB49. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram obtidos e utilizados nos procedimentos de inoculação intravesical de células tumorais. Observou-se que a mortalina encontra-se superexpressa nas amostras de bexigas tumorais. Após a inibição da mortalina, houve uma redução irreversível na viabilidade das células MB49, promovendo o aumento nos índices de apoptose e necrose nestas células. A imunoterapia antitumoral utilizando células MB49 embebidas em matriz de TPG foi capaz de estimular resposta imune sistêmica e afetar o desenvolvimento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo murino ortotópico e singênico.

Palavras chaves: Câncer de Bexiga; Imunoterapia; Mortalina.

ABSTRACT

EFFICACY OF INSTILLATION OF MB49 CELLS AND THERMOREVERSIBLE POLYMERIC GEL IN UROTHELIAL BLADDER CARCINOMA IMMUNIZATION

Among the various types of malignant neoplasms, those originating in the bladder can be considered highly impactful due to their prevalence and high recurrence rates, demonstrating the importance of studies involving new therapeutic possibilities. The MB49 cell line is one of the most used for the study of bladder cancer, through its urinary bladder implantation in murine models of tumor induction. Studies have shown that heat shock proteins, such as mortalin, are vital for resistance to the treatment of neoplasms and are present in all processes associated with carcinogenesis. However, there are still not many studies focused on the use of mortalin as a therapeutic target in urothelial bladder carcinoma. Heat shock proteins are also known to play an important role as mediators of immunogenicity. Activating the immune system for therapeutic benefit has long been a goal in immunology, especially in cancer treatment. Antitumor immunotherapy is a promising treatment against several types of cancer, however the low immunogenicity of vaccines remains a limiting factor in this area. Thus, research involving the investigation of the association of these vaccines with immunogenic adjuvants, such as chitosan, is of great relevance for the study of cancer. This thesis aims to: evaluate the pattern of protein expression of mortalin in tumor bladder tissues, using a western blot assay; the investigation of its inhibition effects with MKT-077 on the viability, apoptosis and necrosis of MB49 cells, through viability tests with resazurin and fluorescence; the establishment of a new murine model for the induction of urothelial bladder carcinoma using a thermoreversible polymeric gel (TPG), composed of chitosan and poloxamer; and the identification of the induction of systemic anti-tumor immune response, through a splenocyte cytotoxicity assay, after intravesical inoculation of TPG and MB49 cells. Female mice of the C57BL/6 strain were obtained and used in intravesical tumor cell inoculation procedures. It was observed that mortalin is overexpressed in tumor bladder samples. After the inhibition of mortalin, there was an irreversible reduction in the viability of MB49 cells, promoting an increase in the rates of apoptosis and necrosis in these cells. Antitumor immunotherapy using MB49 cells embedded in a TPG matrix was able to stimulate systemic immune response and affect the development of bladder urothelial carcinoma in an orthotopic and syngeneic murine model.

Keywords: Bladder Cancer; Immunotherapy; Mortalin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Extensão do câncer de bexiga, de acordo com o sistema TNM para tumores malignos sólidos, em que a invasividade e a disseminação é diferenciada histologicamente..... **33**
- Figura 2.** Estrutura molecular da mortalina e representação gráfica das inúmeras proteínas e complexos de proteínas que interagem com a mesma em diferentes localizações subcelulares. A ligação da mortalina com inúmeras moléculas extramitocondriais destaca sua multifuncionalidade, que envolve desde a regulação da proliferação celular e a participação na cascata apoptótica, até seu papel como um constituinte do sistema imunológico..... **44**
- Figura 3.** Gaiolas individualmente ventiladas para manutenção dos animais no biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar **47**
- Figura 4.** Procedimento de cateterização transuretral e inoculação intravesical em camundongos da linhagem C57BL/6. (A) Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à cateterização transuretral. (B) Após a cateterização e indução da lesão, os animais passaram pelo procedimento de inoculação intravesical e foram mantidos em decúbito dorsal para que o conteúdo instilado permanecesse no interior da bexiga **49**
- Figura 5.** Fluxograma da metodologia de experimentação para indução tumoral e extração de tecido vesical. Os camundongos foram submetidos à indução química da lesão e divididos em dois grupos: Grupo A1 (Sem inoculação de MB49, n = 5); e Grupo A2 (Com a inoculação de MB49, n = 10). Após 21 dias, todos os animais foram eutanasiados e o tecido vesical extraído para avaliação da expressão proteica de mtHsp70..... **50**
- Figura 6.** Procedimento de extração de amostra vesical de camundongos da linhagem C57BL/6, após eutanásia por sobredosagem de anestésicos..... **51**
- Figura 7.** Princípio do ensaio de *western blotting*. O ensaio inicia-se com a preparação e a extração de proteínas das amostras. Após a quantificação, as proteínas são separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é bloqueada e incubada com os anticorpos primários e secundários. Por fim, é feita a detecção da proteína de interesse **52**
- Figura 8.** Análise histológica de tecidos vesicais, corados com hematoxilina e eosina, oriundos de camundongos C57BL/6. (A) Microfotografia de bexiga de animal do grupo sem indução tumoral, apresentando morfologia normal, com ampliação de 20x, barra = 100 µm; (B) 40x, barra = 50 µm; e (C) 100x, barra = 20 µm. (D) Microfotografia de bexiga de animal exposto ao modelo murino de indução singênica e ortotópica de carcinoma urotelial de bexiga, utilizando células MB49, com ampliação de 20x, barra = 100 µm; (E) 40x, barra = 50 µm; e (F) 100x, barra = 20 µm **61**
- Figura 9.** Expressão proteica da mortalina em tumor de bexiga. Os camundongos foram submetidos à indução ortotópica do câncer de bexiga e a expressão da mortalina (mtHsp70) foi determinada por *western blotting*. (A) Representação dos níveis de mtHsp70 (70 kDa) nos homogenatos de tecido de bexiga tumoral em comparação com o tecido de bexiga normal (grupo controle). (B) Nível de expressão de mortalina estimado por análises densitométricas após normalização com beta-actina (42 kDa). Os dados estão expressos como média ± EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise pelo teste T de *Student* (n = 3 camundongos)..... **63**

Figura 10. Avaliação da viabilidade das células MB49 após inibição com MKT-077. Curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade das células MB49 após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações do inibidor de mtHsp70 MKT-077, ou cultivadas por 24 horas adicionais sem exposição ao MKT-077 (pós-tratamento). As células foram cultivadas em quintuplicata e a viabilidade foi analisada com resazurina (70 μ M). Os pontos das curvas dose-resposta (coeficiente de determinação, $R^2 > 0,95$) foram expressos como média \pm EPM. As linhas EC_{50} (metade da concentração efetiva máxima) estão identificadas no gráfico como EC_{50} do tratamento = 3,3 e EC_{50} do pós-tratamento = 4,8 μ g/mL de MKT-077 64

Figura 11. Índice de células MB49 em apoptose, apoptose tardia ou necrose após exposição a 2,0, 5,0 ou 10 μ g/mL do inibidor MKT-077. (A) As células foram cultivadas em quadruplicata e tratadas com o inibidor por 24 horas. (B) As células foram cultivadas em quadruplicata, tratadas com o inibidor por 24 horas e mantidas em cultura por 24 horas adicionais após a retirada do tratamento. Células cultivadas com 10 μ M de H_2O_2 foram consideradas controle positivo para apoptose (CT⁺). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de Tukey para comparações *post-hoc* entre os grupos. Asteriscos denotam significância estatística em comparação com células controle 65

Figura 12. Microfotografias representativas do ensaio de morte celular detectados por laranja de acridina e brometo de etídio em células MB49 após 24 horas de exposição ao MKT-077 ou após 24 horas da retirada do tratamento com o inibidor. As células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços e tratadas com MKT-077 em três diferentes concentrações, 2,5 (B), 5,0 (C) e 10 μ g/mL (D), por 24 horas. Como controle negativo, as células foram cultivadas na ausência de inibidor (A e F) e, como controle positivo de apoptose, as células foram tratadas com H_2O_2 10 μ M (E e J). Células MB49 também foram cultivadas 24 horas após a retirada do tratamento com 2,5 (G), 5,0 (H) e 10 μ g/mL (I). Uma solução contendo laranja de acridina e brometo de etídio foi adicionada em cada poço e a placa foi analisada nos filtros FITC e TexasRed do equipamento ImageXpress® (400 \times). Cada grupo foi realizado em quadruplicata, apresentando características morfológicas semelhantes 66

Figura 13. Avaliação da viabilidade das células MB49 submetidas ao estresse oxidativo, com diferentes concentrações de H_2O_2 , após inibição prévia com MKT-077. Células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços, em quintuplicata, e tratadas com 1 μ g/mL de MKT-077 por 24 horas (linha azul). Células não tratadas com MKT-077 foram consideradas controle negativo para inibição (linha vermelha). Após o tratamento, foram expostas à um ambiente oxidativo provocado por H_2O_2 , em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 mM). As curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade celular obtidas por ensaio de resazurina. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM 68

Figura 14. Análise da resistência oxidativa mediada por mortalina às células tumorais. Os dados de viabilidade obtidos das células MB49 expostas ao estresse oxidativo e, previamente tratadas com MKT-077, foram comparados aos obtidos das células não tratadas com o inibidor e plotados em um gráfico de dispersão. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM, mostrando relações lineares da viabilidade celular relacionadas à concentração de H_2O_2 e ao tratamento com MKT-077 (1 μ g/mL) 69

Figura 15. Comparação das curvas de viabilidade das células MB49 submetidas ao estresse oxidativo, com diferentes concentrações de H_2O_2 , após inibição prévia com 1 ou 2 μ g/mL de MKT-077. Células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços, em quintuplicata, e tratadas com 1 ou 2 μ g/mL de MKT-077 por 24 horas. Após o tratamento, foram expostas ao estresse oxidativo provocado por diferentes concentrações de H_2O_2 (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 mM). As curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade celular obtidas por ensaio de resazurina. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM 70

Figura 16. Representação gráfica da transição de uma solução termorreversível do estado líquido para o estado em forma de gel, evidenciando a formação de ligações cruzadas covalentes entre as cadeias de polímero para formar uma rede macromolecular em temperaturas mais altas..... **85**

Figura 17. Fluxograma da metodologia de experimentação para o possível desenvolvimento de uma nova metodologia de indução tumoral. Os camundongos foram submetidos à indução mecânica da lesão e divididos em três grupos: Grupo B1 (TPG+MB49, n = 20); Grupo B2 (Somente MB49, n = 20); e Grupo B3 (Somente TPG, n = 10). A fim de determinar a sobrevida cumulativa, os animais foram acompanhados por até 50 dias, sendo eutanasiado assim que apresentou hematúria em conjunto com qualquer outro sinal correspondente ao desenvolvimento tumoral **89**

Figura 18. Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após a instilação de células MB49, na presença (Grupo B1, n = 20) ou não (Grupo B2, n = 20) do TPG. Os animais foram acompanhados durante 50 dias, em que o aparecimento de sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral foi observado. Significante de sobrevivência foi obtida após 26 dias, após a morte ou eutanásia de todos os animais do grupo exposto ao TPG, pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em comparação com o grupo controle **93**

Figura 19. Avaliação da viabilidade das células MB49 após exposição ao TPG por 24 horas. O gráfico de barras mostra o resultado do ensaio de viabilidade das células MB49 após a exposição a diferentes concentrações do TPG (6,25, 12,5, 25 e 50%). Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle. As células foram cultivadas em quadruplicata e a viabilidade foi analisada com resazurina (70 μ M). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de *Tukey* para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na viabilidade..... **95**

Figura 20. Matriz tridimensional promovida pelo tratamento com gel polimérico termorreversível em células MB49. As imagens obtidas por microscopia óptica, após a exposição das células MB49 ao TPG a (A) 0%, (B) 25% e (C) 50%, mostram que apesar da viabilidade celular ter diminuído significativamente nos grupos expostos, em especial no grupo exposto ao TPG a 50%, as células permaneceram aderidas no fundo do poço da microplaca **96**

Figura 21. – Avaliação da viabilidade das células MB49 após exposição ao TPG por 24 horas e novo plaqueamento pós-exposição. O gráfico de barras mostra o resultado do ensaio de viabilidade das células MB49 após a exposição a diferentes concentrações do TPG (6,25, 12,5, 25 e 50%). Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle de células viáveis. As células foram cultivadas em quadruplicata e a viabilidade celular foi analisada com resazurina (70 μ M). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de *Tukey* para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na viabilidade **97**

Figura 22. Avaliação da formação de colônias de células MB49 após exposição ao TPG, por 24 horas. O gráfico de barras mostra o resultado da capacidade de proliferação e formação de colônias de células da linhagem MB49, analisada após a exposição ao TPG, nas concentrações de 25 e 50%, seguido de novo plaqueamento com meio DMEM por 48 horas. Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle. As células foram cultivadas em quintuplicata e os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de *Tukey* para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na capacidade de formação de colônias **98**

Figura 23. Interações do sistema imunológico com o método imunoterápico utilizando vacina de células inteiras autólogas. Células dendríticas são atraídas para o local da vacinação, absorvendo o antígeno tumoral presente nas células injetadas. As células dendríticas processam e apresentam o antígeno para linfócitos T, via ligação MHC/TCR, promovendo a destruição das células tumorais no paciente..... **110**

Figura 24. Fórmulas estruturais da quitina e da quitosana, ilustrando o processo de desacetilação para obtenção da quitosana, através de um processo de alcalinização da quitina, sob altas temperaturas **112**

Figura 25. Fluxograma da metodologia de experimentação para imunização utilizando células MB49 e TPG no momento da inoculação intravesical. Os camundongos foram submetidos à indução mecânica da lesão e divididos em três grupos: Grupo TPG+MB49 (n = 18); Grupo TPG (n = 18); e Grupo Controle (n = 18). Após 21 dias, 15 animais de cada grupo foram submetidos à uma nova indução mecânica da lesão, seguida pela indução tumoral, a fim de analisar a progressão tumoral e crescimento vesical pós-desafio. Os 3 animais restantes de cada grupo foram eutanasiados, para que o tecido esplênico fosse coletado e a citotoxicidade dos esplenócitos fosse determinada **117**

Figura 26. Procedimento de extração de esplenócitos por meio do método de compressão das amostras de tecido esplênico. O baço foi seccionado em três partes, acondicionado em placa de petri sobre gelo, comprimido utilizando a parte rugosa de duas lâminas de microscopia e, por fim, o homogenato obtido foi lavado e ressuspendido até a obtenção de uma solução homogênea..... **120**

Figura 27. Sobrevida cumulativa dos animais, previamente imunizados (Grupo TPG+MB49, n = 15) ou não imunizados (Grupos TPG, n = 15, e Controle, n = 15) com TPG, após o desafio com células MB49 (1×10^5 células/camundongo). Os animais foram acompanhados durante 30 dias, sendo observado o aparecimento de sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral. Os grupos foram estatisticamente comparados pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em comparação com o grupo controle **124**

Figura 28. Imagens fotográficas das bexigas extraídas dos animais após eutanásia. Os animais foram previamente imunizados (Grupo TPG+MB49) ou não imunizados (Grupos TPG e Controle) com TPG. Após 20 dias, foi realizado o desafio da imunização com células MB49 (1×10^5 células/camundongo) e os animais foram acompanhados durante 30 dias..... **125**

Figura 29. Análise da taxa de crescimento vesical, após imunização e posterior indução do modelo singênico e ortotópico de câncer urotelial de bexiga, em camundongos C57BL/6. Os animais foram previamente imunizados (Grupo TPG+MB49) ou não imunizados (Grupos TPG e Controle) com TPG e desafiados com células MB49 (1×10^5 células/camundongo). A taxa de crescimento vesical foi calculada, dividindo o peso da bexiga pelo valor em dias da indução até a eutanásia nos animais. Análise estatística realizada por meio do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn* ($p < 0,01$) **126**

Figura 30. Análise da taxa de citotoxicidade dos esplenócitos, após o co-cultivo com as células MB49-GFP⁺. Células tumorais da linhagem MB49-GFP⁺ foram plaqueadas em microplacas e mantidas em estufa incubadora overnight. Após este período, o sobrenadante foi removido e os esplenócitos foram pipetados, nas proporções de 1:10 e 1:50 (MB49-GFP⁺/esplenócitos) e em quadruplicata. A análise da citotoxicidade foi realizada (A) por ensaio de resazurina e (B) por microscopia de fluorescência, através do equipamento ImageXpress. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA de dois fatores ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em relação ao grupo controle **129**

Figura 31. Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de liberação da enzima lactato desidrogenase. O sobrenadante de cada grupo foi pipetado em microplaca, juntamente com uma solução contendo o substrato (tampão, piruvato e azida sódica) e a coenzima (NADH e azida sódica). A densidade óptica foi monitorada usando um leitor de microplacas e o decréscimo da absorbância será proporcional à quantidade de LDH liberada na amostra. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA de dois fatores ($p < 0,005$). Asteriscos denotam significância estatística em relação ao grupo controle **130**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Famílias de proteínas do choque térmico e suas principais funções conhecidas	42
Tabela 1. Composição do tampão de lise RIPA	53
Tabela 2. Composição do tampão de amostra de proteína	54
Tabela 3. Composição dos géis de empilhamento e de separação	55
Tabela 4. Composição da solução salina tris-tamponada com tween 20	56
Tabela 5. Composição da solução tampão bloqueadora	56
Tabela 6. Composição do gel polimérico termorreversível.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG	<i>Bacilo Calmette–Guérin</i>
BSA	<i>Albumina Bovina Sérica</i>
BTA	<i>Antígeno Tumoral da Bexiga</i>
CBMI	<i>Câncer de Bexiga Músculo Invasivo</i>
CBNMI	<i>Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo</i>
CCE	<i>Carcinoma de Células Escamosas</i>
CEUA	<i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>
CFU	<i>Unidade Formadora de Colônia</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CUB	<i>Carcinoma Urotelial de Bexiga</i>
DAMP	<i>Padrão Molecular Associado ao Dano</i>
DATASUS	<i>Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil</i>
DC	<i>Célula Dendrítica</i>
DGE	<i>Departamento de Genética e Evolução</i>
DMBA	<i>7,12-dimetilbenz(a)antraceno</i>
DMEM	<i>Meio Eagle Modificado por Dulbecco</i>
DMP	<i>Departamento de Morfologia e Patologia</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
EC₅₀	<i>Concentração com Metade do Efeito Máximo</i>
EPM	<i>Erro Padrão da Média</i>

ERO	<i>Espécie Reativa de Oxigênio</i>
GFP	<i>Proteína Verde Fluorescente</i>
HE	<i>Técnica de Coloração por Hematoxilina-Eosina</i>
HSP	<i>Proteína do Choque Térmico</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva</i>
kDa	<i>Quilodalton</i>
LA/BE	<i>Laranja de Acridina e Brometo de Etídio</i>
LDH	<i>Lactato Desidrogenase</i>
MHC	<i>Complexo Principal de Histocompatibilidade</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada</i>
NADH	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NMP22	<i>Proteína de Matriz Nuclear Número 22</i>
NP	<i>Nanopartícula</i>
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
PBS	<i>Tampão Fosfato-Salino</i>
PRR	<i>Receptor de Reconhecimento de Padrão</i>
SDS	<i>Dodecil Sulfato de Sódio</i>
SDS-PAGE	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio</i>
SFB	<i>Soro Fetal Bovino</i>

SIM	<i>Sistema de Informações sobre Mortalidade</i>
Ta	<i>Carcinoma Papilar Não Invasivo</i>
TCR	<i>Receptor de Células T</i>
TFD	<i>Terapia Fotodinâmica</i>
Tis	<i>Carcinoma Plano Não Invasivo in situ</i>
TMN	<i>Tumor, Nodo e Metástase</i>
TPG	<i>Gel Polimérico Termorreversível</i>
TTBS	<i>Solução Salina Tris-Tamponada com Tween 20</i>
UFSCar	<i>Universidade Federal de São Carlos</i>
UICC	<i>União Internacional para Controle do Câncer</i>
USP	<i>Universidade de São Paulo</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. O CÂNCER.....	25
2.2. CÂNCER DE BEXIGA	27
2.3. FATORES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE BEXIGA	29
2.4. SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BEXIGA	31
2.5. O ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA	32
2.6. TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA	34
3. CAPÍTULO 1 – Padrão de expressão proteica da mortalina em tecidos tumorais de bexiga induzidos pela implantação ortotópica singênica de células MB49 e importância de sua atividade para a viabilidade celular, principalmente em situações de estresse oxidativo	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT	39
3.1. <i>INTRODUÇÃO</i>	40
3.1.1. MARCADORES MOLECULARES E O CÂNCER DE BEXIGA	40
3.1.2. PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO	41
3.1.3. PROTEÍNA MITOCONDRIAL DE CHOQUE TÉRMICO mtHsp70	43
3.2. <i>OBJETIVOS</i>	46
3.2.1. OBJETIVO GERAL.....	46
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3.3. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	47
3.3.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	47
3.3.2. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS	48
3.3.3. CATETERIZAÇÃO TRANSURETRAL E INDUÇÃO DA LESÃO.....	48
3.3.4. INOCULAÇÃO INTRAVESICAL DE CÉLULAS TUMORAIS.....	49
3.3.5. EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO VESICAL	50
3.3.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA.....	51
3.3.7. ENSAIO DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	52
3.3.7.1. Extração de Proteínas das Amostras Vesicais.....	53

3.3.7.2.	Quantificação de Proteínas Totais	53
3.3.7.3.	Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida	54
3.3.7.4.	Eletrotransferência em Sistema Submerso	55
3.3.7.5.	Bloqueio de Ligações Inespecíficas	56
3.3.7.6.	Incubação com Anticorpos Primários e Secundários	57
3.3.7.7.	Deteção por Quimioluminescência	57
3.3.8.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA	57
3.3.9.	ENSAIO DE COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE).....	58
3.3.10.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA EM AMBIENTE OXIDATIVO.....	59
3.3.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
3.4.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	61
3.4.1.	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO VESICAL TUMORAL	61
3.4.2.	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA mtHsp70.....	62
3.4.3.	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR APÓS A INIBIÇÃO DA mtHsp70	63
3.4.4.	ÍNDICE DE APOPTOSE, NECROSE E VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM MKT-077.....	64
3.4.5.	ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS MB49 EXPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS TRATAMENTO COM MKT-077	67
3.5.	<i>CONCLUSÕES</i>	71
3.6.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	72
4.	CAPÍTULO 2 – Estabelecimento de modelo murino para indução tumoral de carcinoma urotelial de bexiga, utilizando um sistema de liberação com gel polimérico termorreversível	79
	RESUMO.....	80
	ABSTRACT	81
4.1.	<i>INTRODUÇÃO</i>	82
4.1.1.	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	82
4.1.2.	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO ESTUDO DO CÂNCER	82
4.1.3.	MODELO EXPERIMENTAL COM CÉLULAS MB49	84
4.1.4.	GÉIS POLIMÉRICOS TERMORREVERSÍVEIS.....	84

4.2.	<i>OBJETIVOS</i>	86
4.2.1.	OBJETIVO GERAL.....	86
4.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	86
4.3.	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	87
4.3.1.	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	87
4.3.2.	PREPARAÇÃO DO GEL POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL.....	87
4.3.3.	CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS	87
4.3.4.	CATETERIZAÇÃO TRANSURETRAL E INDUÇÃO DA LESÃO.....	88
4.3.5.	INOCULAÇÃO INTRAVESICAL DE CÉLULAS TUMORAIS	88
4.3.6.	ACOMPANHAMENTO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	89
4.3.6.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA	90
4.3.6.	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....	90
4.3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
4.4.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	92
4.4.1.	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA CUMULATIVA DOS ANIMAIS	92
4.4.1.	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO TPG.....	94
4.4.1.	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	97
4.5.	<i>CONCLUSÕES</i>	99
4.6.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	100
5.	CAPÍTULO 3 – Imunoterapia intravesical com células MB49 embebidas em matriz de gel termorreversível estimula resposta imunológica antitumoral e bloqueia o desenvolvimento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo murino C57BL/6 ortotópico e singênico.....	104
	RESUMO.....	105
	ABSTRACT	106
5.1.	<i>INTRODUÇÃO</i>	107
5.1.1.	SISTEMA IMUNE E IMUNOGENICIDADE TUMORAL	107
5.1.2.	IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER	108
5.1.3.	QUITOSANA COMO ADJUVANTE	110
5.2.	<i>OBJETIVOS</i>	115
5.2.1.	OBJETIVO GERAL.....	115
5.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	115

5.3.	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	116
5.3.1.	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	116
5.3.2.	PREPARAÇÃO DO TPG E CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS....	116
5.3.5.	IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM MB49 E TPG	116
5.3.6.	DESAFIO <i>IN VIVO</i> DA IMUNIZAÇÃO COM CÉLULAS TUMORAIS..	118
5.3.7.	EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO VESICAL	118
5.3.8.	EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO	119
5.3.9.	EXTRAÇÃO DE ESPLENÓCITOS	119
5.3.10.	ENSAIO DE CO-CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS E ESPLENÓCITOS.....	121
5.3.11.	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO POR ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA	121
5.3.12.	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO POR ENSAIO DE RESAZURINA.....	121
5.3.13.	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO PELA LIBERAÇÃO DE LDH	122
5.3.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	122
5.4.	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	124
5.4.3.	ANÁLISE DA PROGRESSÃO TUMORAL PÓS-IMUNIZAÇÃO	124
5.4.4.	QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ESPLENÓCITOS CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS TUMORAIS.....	128
5.4.5.	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELA LIBERAÇÃO DE LDH.....	129
5.5.	<i>CONCLUSÕES</i>	131
5.6.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	132
6.	CONCLUSÃO GERAL	140
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
	ANEXO A	153
	ANEXO B	154
	ANEXO C	155

1. INTRODUÇÃO GERAL

As células, unidades estruturais e funcionais que constituem os seres vivos, estão a todo momento se dividindo em nosso organismo. Diariamente, trilhões de novas células são geradas e vão substituindo células velhas ou danificadas, conforme necessário (BIANCONI *et al.*, 2013; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). As neoplasias se iniciam quando alterações genéticas ou epigenéticas interferem este processo ordenado, promovendo a proliferação descontrolada. Eventualmente, essas células neoplásicas podem formar uma massa tumoral, que pode ser classificada em benigna ou maligna (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Câncer é o nome dado às neoplasias malignas, que têm como característica principal o crescimento metastático, isto é, a capacidade de invadir tecidos próximos ou se espalhar para partes distantes no organismo, através do sangue ou do sistema linfático, formando tumores secundários distantes do sítio primário (HAUSMAN, 2019). O sistema imunológico exerce um importante papel neste processo de carcinogênese, reconhecendo antígenos tumorais, porém, ao mesmo tempo em que destrói as células neoplásicas, acaba por selecionar clones emergentes com baixa imunogenicidade (GREAVES e MALEY, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2018).

O câncer pode surgir em praticamente qualquer lugar do corpo humano e, dentre os diversos tipos de neoplasias malignas, as que se originam na bexiga podem ser consideradas uma das mais frequentes em todo o mundo (BRAY *et al.*, 2018). Apesar disso, até o presente momento, não existem grandes avanços nos métodos diagnósticos ou nas técnicas de tratamento, refletindo em altos índices de recorrência e demonstrando a imprescindível necessidade de estudos envolvendo novas possibilidades terapêuticas menos invasivas e mais efetivas (AVRITSCHER *et al.*, 2006; YEUNG *et al.*, 2014).

Modelos murinos de indução tumoral singênicos são os modelos mais utilizados para avaliar a terapia antitumoral e aperfeiçoar as técnicas terapêuticas atuais. No estudo do câncer de bexiga, uma das linhagens celulares mais utilizadas é a MB49, isolada de camundongos C57BL/6 (SUMMERHAYES e FRANKS, 1979). O tumor induzido com este modelo apresenta uma grande semelhança do encontrado no ser humano, no entanto, a taxa de sucesso de indução é altamente heterogênea. Assim, o estabelecimento de novos modelos animais confiáveis, simples e reproduzíveis continua sendo um desafio (CHEN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015).

Marcadores genéticos têm sido amplamente estudados em diversos tipos de cânceres, a fim de melhorar o tratamento e o prognóstico do paciente. Para o câncer de bexiga, a identificação desses marcadores é fundamental para a diminuição dos índices de morbidade e mortalidade da doença (MITRA e COTE, 2010). As proteínas de choque térmico são consideradas marcadores tumorais de grande potencial, pois sua expressão pode estar relacionada a carcinogênese, angiogênese, metástase e reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imunológico (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005; CALDERWOOD *et al.*, 2006).

A mortalina, uma proteína mitocondrial de choque térmico, é uma das chaperonas mais avaliadas em estudos sobre o câncer, devido ao seu conhecido mecanismo de promoção à carcinogênese, por interagir e inativar a p53, uma proteína citoplasmática supressora tumoral (MA *et al.*, 2006; WADHWA *et al.*, 1998). Mesmo com o grande indicativo das vantagens do estudo da mortalina como marcadora molecular em diversos tipos de neoplasias, ainda não existem muitos estudos voltados para sua utilização no carcinoma urotelial de bexiga.

As proteínas do choque térmico também são conhecidas por desempenharem um importante papel como mediadoras da imunogenicidade (ISCHIA e SO, 2013). Assim, técnicas envolvendo a modulação da expressão dessas proteínas, em conjunto com imunoterapias, também podem apresentar uma interessante opção para o tratamento antitumoral. Vacinas de células inteiras autólogas contra o câncer representam uma categoria de imunoterapia antitumoral ativa e têm por objetivo fornecer vários antígenos tumorais específicos para o reconhecimento imunológico (RAMIREZ-MONTAGUT, 2015).

Apesar da imunoterapia ser um tratamento promissor contra diversos tipos de cânceres, a baixa imunogenicidade das vacinas continua a ser um fator limitante nesta área. Assim, pesquisas envolvendo a investigação da associação dessas vacinas com adjuvantes imunogênicos, são de grande relevância para o estudo do câncer. Adjuvantes são compostos adicionados às vacinas, os quais aumentam a resposta imune, podendo ser classificados em potencializadores imunológicos ou sistemas de liberação (RAMIREZ-MONTAGUT, 2015).

Sistemas de liberação de uso prolongado permitem um maior tempo de permanência do fármaco administrado no organismo, podendo atuar também como depósito de antígeno. O poloxamer 407 é um copolímero atóxico, com alta capacidade de liberação e reversibilidade entre os estados líquido e gel. Géis termorreversíveis

para a aplicação de vacinas intravesicais são interessantes como sistemas de liberação, uma vez que são líquidos à temperatura ambiente e gelificam à temperatura fisiológica, favorecendo o tempo de permanência da vacina no local de ação (DUMORTIER *et al.*, 2006; GABIZON *et al.*, 2012).

Alguns polímeros biodegradáveis, como a quitosana, têm sido avaliados como potencializadores da imunogenicidade, provando serem candidatos promissores para a substituição de adjuvantes convencionais. A quitosana é um polímero natural que exhibe propriedades que a caracterizam como um excelente adjuvante imunológico, como sua capacidade em promover a maturação de células dendríticas e sua atuação como depósito de antígeno (ZAHAROFF, *et al.*, 2006).

Fundamentada em toda a temática abordada nesta introdução, esta tese tem por objetivo esclarecer três pontos principais: o padrão de expressão proteica da mortalina em tecidos vesicais tumorais e os efeitos de sua inibição com MKT-077; o estabelecimento de um novo modelo murino para a indução do carcinoma urotelial de bexiga, na presença de um gel polimérico termorreversível, composto por quitosana e poloxamer; e a estimulação de resposta imunológica antitumoral, após inoculação intravesical deste gel polimérico termorreversível e células MB49.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O CÂNCER

A palavra neoplasia, do grego “novo crescimento”, é utilizada na Patologia para descrever os tecidos recém surgidos, compostos por células cuja proliferação é geneticamente alterada, apresentando rápido, progressivo e incontrolável crescimento. De maneira básica, as neoplasias podem ser categorizadas em benignas ou malignas (HALAZONETIS *et al.*, 2008).

As neoplasias benignas, cujo crescimento limita-se ao seu sítio de origem, se assemelham morfológica e, até mesmo, funcionalmente às células normais. A massa tumoral benigna é normalmente bem delineada, podendo ser removida completamente por cirurgia e apresentando baixa taxa de recorrência. É de suma importância enfatizar que alguns tipos raros de neoplasias benignas, com o passar do tempo, podem se transformar em neoplasias malignas (LODISH *et al.*, 2000).

Em contrapartida, o câncer é uma neoplasia maligna identificada pelo crescimento metastático, isto é, a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou áreas distantes no organismo do hospedeiro. Também pode ser descrito como um conjunto de doenças distintas, que acometem os seres vivos multicelulares há mais de 200 milhões de anos. Existem evidências de câncer entre os ancestrais dos humanos modernos remontando a mais de um milhão de anos (HAUSMAN, 2019).

A carcinogênese envolve numerosas alterações genéticas e epigenéticas que promovem instabilidade genômica caracterizada pela aquisição de sete propriedades fundamentais: proliferação autossuficiente, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, mecanismos de escape à apoptose, potencial ilimitado de replicação, angiogênese aprimorada, metástase (SHERR, 1996; HANAHAN e WEINBERG, 2011) e, por fim mecanismos de escape do Sistema Imunológico (KHONG e RESTIFO, 2002).

Em organismos unicelulares, existe uma pressão evolutiva para que ocorra uma rápida reprodução assim que nutrientes estão disponíveis. Já em organismos multicelulares, como a maioria das células já está naturalmente exposta a um suprimento constante de nutrientes, a replicação constante não é necessária. Células neoplásicas adquirem mutações genéticas que alteram funcionalmente algumas vias

de sinalização responsáveis por captar e metabolizar nutrientes, promovendo altos índices de crescimento e de sobrevivência celular (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009).

Na era da biologia molecular, grande parte das pesquisas na área do câncer tem por objetivo o estudo de suas bases genéticas, a fim de explicar sua natureza progressiva (HALAZONETIS *et al.*, 2008). De uma perspectiva evolutiva, uma neoplasia pode ser vista como uma grande população genética e epigeneticamente heterogênea de células individuais. Mutações obtidas durante a replicação celular são introduzidas nos genomas das células filhas e, na maioria das neoplasias, alterações cromossômicas estruturais, como deleções ou duplicações, ocorrem frequentemente (GRAHAM e SOTTORIVA, 2016).

Desta maneira, o grau de variabilidade em subclones neoplásicos pode prever a progressão para a malignidade. Além disso, essa heterogeneidade apresenta um problema para o diagnóstico e tratamento de neoplasias, já que uma amostra de biópsia pode não ser representativa da neoplasia e, após a coleta da amostra, a progressão da neoplasia continuará (MERLO *et al.*, 2006).

Outra característica importante para a progressão de neoplasias é sua interação com o microambiente circundante, por exemplo, células que compõem o sistema imune, células do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e matriz extracelular. Para que uma neoplasia evolua e promova risco à vida do hospedeiro, deve desenvolver quatro características essenciais: capacidade de invasão; de degradação da matriz extracelular; de sobrevivência no sistema circulatório; e de estabelecimento em um novo ambiente tecidual (WANG *et al.*, 2018).

A influência do microambiente tumoral pode levar à liberação de sinais extracelulares, promoção de angiogênese, indução de tolerância à imunidade periférica e contribuição para a heterogeneidade tumoral. (WANG *et al.*, 2018). Também é descrita na literatura, a correlação entre a inflamação promovida no microambiente tumoral, pelas células do sistema imune, com a conversão maligna de uma neoplasia (KARIN, 2006).

A inflamação aguda pode contribuir para a regressão tumoral, mas, em contrapartida, cânceres tendem a ocorrer em locais de inflamação crônica (COUSSENS e WERB, 2002). Especula-se que espécies reativas de oxigênio geradas por células inflamatórias, bem como a presença de diversos mediadores no microambiente inflamatório, incluindo citocinas, quimiocinas e enzimas,

favoreçam o processo de mutagenicidade (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; PHILIP *et al.*, 2004).

Mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer anualmente e estima-se que essa taxa aumente para 16 milhões em 2020. O câncer também é uma das principais causas de morte global, sendo responsável por uma a cada seis mortes em todo o mundo. Estima-se que o câncer foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018 (SIEGEL *et al.*, 2017; OMS, 2018)

Aproximadamente 70% de todas as mortes por câncer ocorrem em países de baixa ou média renda, em que o diagnóstico e tratamento são comumente inacessíveis. Em 2017, apenas 26% dos países de baixa renda relataram possuir serviços especializados disponíveis no setor público para diagnosticar e tratar pacientes com câncer. O impacto econômico anual do câncer é significativo, sendo estimado em aproximadamente 1,16 trilhão de dólares em 2010 (STEWART e WILD, 2014; OMS, 2018).

2.2. CÂNCER DE BEXIGA

Dentre os diversos tipos de cânceres que acometem a humanidade, os que se originam na bexiga podem ser considerados uma das neoplasias malignas mais comuns, sendo a 6ª de maior prevalência em homens e a 17ª em mulheres, com uma estimativa de 550.000 novos casos em 2018 (BRAY *et al.*, 2018). O câncer de bexiga apresenta uma alta taxa de recorrência, bem como um grande risco de progressão, devido ao curso imprevisível da doença. O acompanhamento dos pacientes diagnosticados com câncer de bexiga demanda um monitoramento contínuo e caro, que representa um grande impacto econômico para o sistema de saúde público. (BOTTEMAN *et al.*, 2003; SVATEK *et al.*, 2014; YEUNG *et al.*, 2014).

Estima-se que, durante o triênio 2020-2022, o número de novos casos de câncer de bexiga por ano no Brasil seja de 10.640, sendo 7.590 casos em homens e de 3.050 em mulheres (BRASIL, 2019). Os últimos levantamentos acerca da taxa de mortalidade por câncer de bexiga no Brasil datam de 2017 e mostram a incidência de 4.355 óbitos, sendo 3.021 óbitos (2,99/100 mil) em homens e 1.334 (1,29/100 mil) em mulheres (BRASIL, 2017). Na Região Sudeste do território brasileiro, o câncer de bexiga ocupa a sexta posição dentre os tipos mais frequentes de tumores em homens, com incidência aproximada de 10 casos a cada 100 mil homens. Em mulheres, é o

décimo quarto tipo de tumor mais frequente, com incidência em torno de 4 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2019).

O câncer de bexiga pode ser classificado de acordo com suas características histológicas, isto é, devido ao tipo celular do qual ele é proveniente, sendo eles: o carcinoma urotelial de bexiga (CUB), o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma. (AL-MAMARI e AL-BUSAIDY, 2015).

O adenocarcinoma é uma neoplasia maligna rara originada no urotélio, que histologicamente se apresenta com fenótipo glandular puro, e corresponde de 0,5 a 2% dos cânceres de bexiga (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2004). Geralmente surge no trígono e na parede posterior da bexiga, porém pode ser encontrado em qualquer outro sítio vesical (EPSTEIN *et al.*, 2010). Usualmente, apresenta uma lesão solitária, ao contrário do carcinoma urotelial que tende a ser multifocal, e pode surgir como uma lesão papilar, séssil, sólida ou ulcerativa (ISMAIL *et al.*, 2019). Apresenta padrões distintos de crescimento, podendo ser do tipo entérico (cólón), adenocarcinoma não especificado, células em anel de sinete, mucinoso, células claras, hepatoide ou misto (ABENOZA *et al.*, 1987; BURGUÉS *et al.*, 1999; DADHANIA *et al.*, 2015).

O CCE é uma neoplasia epitelial, responsável por aproximadamente 4% de todos os casos de câncer de bexiga. Demonstra exclusivamente características escamosas, como pérolas escamosas, pontes intercelulares e grânulos de queratohialina (DAHM e GSCHEWEND, 2003). Seu diagnóstico é restrito para fenótipo puro de tumores de células escamosas (FAYSAL, 1981). Microscopicamente, o CCE pode ser classificado em bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado. O CCE bem diferenciado apresenta ilhas de células escamosas com queratinização bem definidas, pontes intercelulares proeminentes e mínimo pleomorfismo nuclear das células escamosas. O CCE pouco diferenciado apresenta apenas uma diferenciação escamosa focal e pleomorfismo (GRIGNON, 1997).

De acordo com a morfologia, o CCE pode ser dividido conforme sua relação com a esquistossomose (ABOL-ENEIN *et al.*, 2007), em que o CCE associado aos pacientes portadores da doença geralmente apresenta-se como uma neoplasia não-papilar sólida (YOUSSEF *et al.*, 2010), com característica nodular e pouca anaplasia nuclear (EISSA *et al.*, 2012). Já o CCE sem relação com a esquistossomose apresenta-se como um tumor solitário, necrosado ou séssil, mas com características extensivas (RUNDLE *et al.*, 1982).

O carcinoma urotelial de bexiga é o tipo mais frequente, sendo responsável por mais de 90% de todos os cânceres de bexiga. A principal característica do CUB é a invasão para além da membrana basal celular (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2004), possuindo a propensão de ser multicêntrico com tumores sincrônicos e metacrônicos de bexiga e tratos urinários superiores (MURPHY *et al.*, 2004). Este tipo de neoplasia origina-se no urotélio e apresenta um amplo espectro de manifestações. Em um extremo, a doença pode se apresentar em baixo grau histológico com lesões não-músculo invasivas, as quais possuem frequência de recorrência e precisam de monitoramento a longo prazo, mas apresentam baixo risco de progressão. Em outro extremo, pode apresentar lesões músculo invasivas, com alto risco para o paciente e requisitando tratamento imediato. (PRASAD *et al.*, 2011).

Tumores não-invasivos podem ser divididos em duas categorias: papilar e plano. Carcinoma destituído de estruturas papilares é denominado de carcinoma *in situ* (CIS) e, por definição, de alto grau histológico. Pode exibir um amplo espectro de atipia e progressão para malignidade. Os tumores papilares são bem diversos, podendo incluir papilomas, proliferação urotelial papilar de baixo potencial maligno e carcinoma papilar de baixo e alto grau histológico (EPSTEIN *et al.*, 1998).

Em relação aos tumores invasivos, existem diversas variantes conforme a morfologia da neoplasia, incluindo tipos entérico e mucinoso. A variante mais comum é o carcinoma urotelial invasivo, que apresenta diferenciação divergente (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2019). Além disso, também pode-se encontrar nessa categoria de tumores invasivos: tipos em ninhos, microcístico, micropapilar, linfóepitelioma, plasmacitoide ou anel em singleto, sarcomatoide, células gigantes, células lipídicas, células claras, células pouco diferenciadas, tumor mülleriano e tumores que surgem no divertículo de bexiga (HUMPHREY *et al.*, 2016). Apesar dessas variações, o prognóstico geralmente é similar (KIM *et al.*, 2012).

2.3. FATORES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE BEXIGA

O risco de desenvolvimento do câncer de bexiga pode estar relacionado tanto a fatores endógenos, quanto exógenos. Dentre os fatores endógenos, o gênero e a idade dos indivíduos estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da enfermidade. Dados de prevalência indicam que esta doença acomete preferencialmente indivíduos do sexo masculino em comparação aos do sexo

feminino, na proporção de 3:1 (FERLAY *et al.*, 2015; ANTONI *et al.*, 2017). A disparidade na incidência do câncer de bexiga entre gêneros ainda não é bem esclarecida na literatura, no entanto, é provável que fatores biológicos, como anatomia e composição de hormônios sexuais possam estar envolvidos (ZHANG, 2013).

A incidência desta doença também tem uma relação diretamente proporcional com a faixa etária dos indivíduos, visto que, com o avanço da idade, o risco de desenvolvimento da doença aumenta gradativamente (SHARIAT *et al.*, 2009). A idade média para o diagnóstico do câncer de bexiga é de 69 anos para os homens e 71 anos para mulheres (MADEB e MESSING, 2004).

Também existe uma forte correlação entre predisposição genética e câncer de bexiga, já que familiares em primeiro grau de indivíduos diagnosticados com a doença apresentam o dobro do risco de desenvolver esse tipo de câncer (BURGER *et al.*, 2013). Estudos genômicos em vários estágios do câncer de bexiga demonstraram possíveis mutações em diferentes genes e cromossomos que podem ser associadas ao aumento do risco de desenvolver câncer de bexiga (ROTHMAN *et al.*, 2010). É importante ressaltar que os fatores genéticos não são os responsáveis diretos pelo desenvolvimento neoplásico, apenas amentam a susceptibilidade do indivíduo em desenvolver o câncer após a exposição aos fatores etiológicos exógenos (BURGER *et al.*, 2013).

Dentre os fatores exógenos, o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga é o uso do tabaco, com fumantes de cigarro apresentando um risco aproximadamente três vezes maior em comparação com não fumantes. Estima-se que cerca de um quarto dos cânceres de bexiga em mulheres e quase metade de todos os cânceres de bexiga em homens pode ser atribuída ao tabagismo (VAN OSCH *et al.*, 2016).

A exposição ocupacional a agentes cancerígenos também está associada com o câncer de bexiga, constituindo o segundo fator de risco exógeno mais importante no desenvolvimento desta doença. Indivíduos que trabalham com tabaco, tintura, borracha, metal ou petróleo, limpadores de chaminés e cabeleireiros fazem parte do grupo de risco (CUMBERBATCH *et al.*, 2015).

Os agentes carcinogênicos presentes no tabaco ou em produtos de combustão, como aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e os metais pesados, como o arsênico, podem causar danos ao DNA das células vesicais e promover o câncer de bexiga, uma vez que são excretados normalmente pela urina,

tendo assim contato direto com todo o sistema urinário (STERN *et al.*, 2009; LETASIOVÁ *et al.*, 2012).

Além destes fatores exógenos que contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento desta doença, também podem ser citados a exposição a radiações ionizantes e o uso de diversos quimioterápicos, como a ciclofosfamida. O *Schistosoma haematobium*, um parasita que infecta a bexiga, se reproduz nas veias da bexiga e seus ovos causam uma inflamação crônica da parede vesical, podendo levar ao desenvolvimento do câncer de bexiga nos indivíduos infectados (KNOWLES e HURST, 2015).

2.4. SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BEXIGA

O sinal clínico mais importante para o diagnóstico do câncer de bexiga é a presença de sangue na urina, conhecido como hematúria. A hematúria é geralmente indolor e frequentemente intermitente, podendo ser classificada em microscópica ou macroscópica. Cerca de 65% dos cânceres de bexiga são diagnosticados após o paciente apresentar sangue macroscópico na urina, possuindo o maior valor preditivo positivo para este tipo de neoplasia. (SCHMIDT-HANSEN *et al.*, 2015).

Sintomas de menor risco incluem disúria (desconforto ou dor ao urinar), polaciúria (micção frequente), urgência miccional repentina e infecções frequentes do trato urinário. Pacientes em estágio avançado da doença também podem apresentar perda de peso, dor abdominal, devido à obstrução ureteral, aparecimento de massa pélvica palpável e, em casos menos frequentes, dor óssea devido à presença de metástase (EBLE *et al.*, 2004; KIRKALI *et al.*, 2005). Tumores infiltrando o meato ureteral geram hidronefrose, a qual é considerada um sinal de um prognóstico negativo (LEIBOVITCH *et al.*, 1993).

Assim que o paciente se apresenta ao sistema de saúde com hematúria macroscópica ou qualquer outro sintoma, o primeiro procedimento diagnóstico a ser realizado é a cistoscopia, um exame que permite a visualização direta das lesões da parede da bexiga. A cistoscopia utiliza um endoscópio, sob anestesia local, e é considerada altamente invasiva (KRIEGMAIR *et al.*, 1999).

Em conjunto com a cistoscopia são frequentemente realizados um exame de urina, a fim de detectar possíveis infecções, e uma citologia urinária, em que é realizada a análise microscópica da urina para detectar células atípicas, bem como a

presença de hematúria. Existem casos em que a urina do paciente pode apresentar células malignas e produtos tumorais (MESSING e VAILLANCOURT, 1990). A citologia urinária também será utilizada para o acompanhamento do paciente após o tratamento, devido a facilidade de coleta e ausência de invasividade da técnica (BROWN, 2000).

Uma tomografia computadorizada também pode ser utilizada para obter uma imagem radiológica da bexiga e dos rins, a fim de descartar possíveis causas de hematúria advindas do trato urinário superior, e para estimar o estadiamento tumoral, caso seja diagnosticado o câncer de bexiga (VERMA *et al.*, 2012).

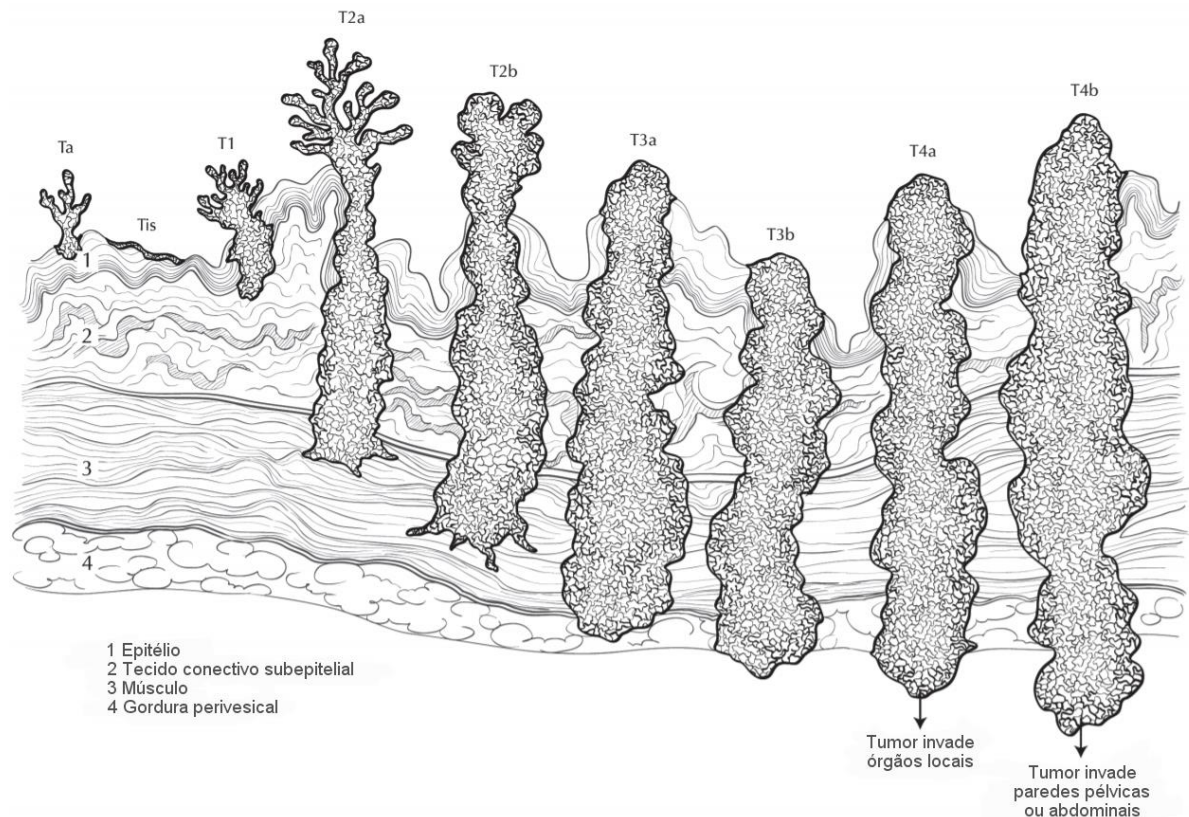
Caso alguma lesão tumoral for encontrada na bexiga, será realizada a ressecção transuretral do tumor para obtenção do diagnóstico histopatológico. Neste procedimento, um ressectoscópio é usado para remover completamente a lesão superficial ou para realizar uma biópsia, quando o tumor é do tipo músculo invasivo. A ressecção é considerada uma técnica altamente invasiva e pode provocar repetidas lesões no local, aumentando assim o risco de recorrência. (GRIMM *et al.*, 2003).

2.5. O ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA

Após a avaliação do estágio inicial do tumor, baseada nos resultados de palpação, cistoscopia ou exames de imagem, é necessária uma avaliação mais profunda para sua categorização. Essa análise é realizada na amostra obtida através da ressecção transuretral e utiliza o sistema de classificação TNM (tumor, nodo e metástase). O sistema TNM é um padrão utilizado mundialmente para a classificação de tumores malignos sólidos. De acordo com este sistema, o estágio tumoral baseia-se em algumas características, como o tamanho do tumor primário, sua disseminação local ou até um linfonodo e a presença de metástase (DENOIX, 1944).

Atualmente, a União Internacional para Controle do Câncer (UICC) administra o sistema TNM e institui que, para o câncer de bexiga, existem diversos estágios, diferindo entre si na invasividade e disseminação. O estágio do tumor descreve o quão profundo o tumor cresceu na parede da bexiga e se ele se estendeu para outros órgãos. O câncer de bexiga é amplamente dividido em câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI), com os estágios *Ta*, *Tis* e *T1*, e câncer de bexiga músculo invasivo (CBMI), com os estágios *T2* ao *T4* (Figura 1) (BABJUK *et al.*, 2019; WITJES *et al.*, 2019).

Figura 1 – Extensão do câncer de bexiga, de acordo com o sistema TNM para tumores malignos sólidos, em que a invasividade e a disseminação é diferenciada histologicamente.



Fonte: EDGE *et al.* (2010).

O estágio carcinoma plano não invasivo *in situ* (*Tis*) indica que o tumor está crescendo paralelamente à camada interna da bexiga. No estágio de carcinoma papilar não invasivo (*Ta*), o tumor cresceu em direção ao centro do interior da bexiga, não atingindo o tecido conjuntivo ou o músculo da parede vesical. A partir do estágio *Ta*, temos quatro outros estágios (*T1*, *T2*, *T3* ou *T4*), em que quanto maior o número, maior a invasão do tumor nos tecidos conjuntivo ou muscular (BRASIL, 2004).

No estágio *T1*, o tumor invade a camada de tecido conjuntivo. Em *T2*, o tumor invade a camada muscular superficial interna (*T2a*) ou externa (*T2b*) da parede da bexiga. Em *T3*, o tumor cresceu através da camada muscular da bexiga, invadindo o tecido perivesical microscopicamente (*T3a*) ou macroscopicamente (*T3b*). No estágio *T4*, o tumor é classificado em *T4a* ou *T4b*. Em *T4a*, o tumor pode ter se espalhado para a próstata, vesículas seminais, útero ou vagina. Em *T4b*, apresenta crescimento na parede pélvica ou abdominal (BRASIL, 2004).

Cada um desses estágios pode apresentar variações em relação a extensão da invasão do tumor nos linfonodos, classificadas de *N0* a *N3*. Em *N0*, o tumor não se

espalhou para os linfonodos próximos. Entre *N1* e *N3*, o câncer pode ter se espalhado para um linfonodo próximo, na pelve menor (*N1*), para dois ou mais linfonodos, nessa mesma área (*N2*), ou para os linfonodos ao longo das artérias ilíacas comuns (*N3*) (BRASIL, 2004).

Quanto a presença ou não de metástase, o tumor pode ser classificado como *M0* ou *M1*. Em *M0*, não houve metástase para locais distantes no corpo. Caso tenha se espalhado para os linfonodos distantes é classificado como *M1a* e quando alcançou um ou mais órgãos distantes, como ossos, fígado ou pulmões, é classificado como *M1b* (BRASIL, 2004).

2.6. TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA

Como dito anteriormente, a ressecção transuretral é um procedimento diagnóstico e terapêutico, visto que a remoção total e bem-sucedida da lesão pode ser curativa. Apesar deste método ser recomendado para o CBNMI, o risco de recorrência é alto. Assim, as ressecções devem ser acompanhadas de terapias com instilações intravesicais de quimioterápicos ou tratamentos imunomoduladores, como o tratamento baseado no bacilo *Calmette–Guérin* (BCG) (HERR, 1999).

O BCG é utilizado na medicina moderna desde o início do século XX, como uma vacina viva atenuada contra a tuberculose (CALMETTE *et al.*, 1927). Já na década de 1930, observou-se que os pacientes com tuberculose apresentavam uma significativa redução na incidência de cânceres, sendo o BCG proposto como uma potencial terapia antitumoral (PEARL, 1929). No tratamento específico contra o câncer de bexiga, o primeiro uso de BCG foi relatado em 1976. (MORALES *et al.*, 1976).

O objetivo da terapia complementar com instilação intravesical de BCG é prevenir a implantação do tumor após a ressecção e eliminar a doença residual, diminuindo os riscos de recorrência e progressão. No entanto, o modo de ação desta imunoterapia é complexo e ainda não é totalmente compreendido, dependendo de interações moleculares entre o paciente, o sistema imunológico e a neoplasia (KAWAI *et al.*, 2013; REDELMAN-SIDI *et al.*, 2014).

Embora o tratamento com BCG seja eficaz, 30 a 40% dos pacientes não são curados e também existem relatos que a taxa de sobrevivência para pacientes que progridem de CBNMI para CBMI é menor do que aqueles sem histórico prévio de CBNMI (WITJES, 2006; VAN DEN BOSCH e WITJES, 2011).

A utilização de BCG é limitada devido à toxicidade e respectiva elegibilidade dos pacientes, bem como por uma recente escassez de oferta associada à sua produção (MOSTAFID *et al.*, 2015). Nos casos em que o tratamento com BCG é contraindicado, a instilação intravesical com quimioterápicos é recomendada como segunda opção (CHEUNG, *et al.*, 2013).

A quimioterapia citostática intravesical, utilizando mitomicina C, epirrubicina ou pirarrubicina, demonstrou reduzir significativamente a taxa de recorrências, mas mostra pouco efeito na taxa de progressão (SYLVESTER *et al.*, 2016). A gemcitabina é outro quimioterápico utilizado para esse tipo de tratamento, porém, em comparação aos pacientes com CBNMI de alto risco tratados somente com BCG, promove maior taxa de progressão e recorrência (SHELLEY, *et al.*, 2012).

Em conclusão, para os casos de CBNMI, o tratamento intravesical com BCG é geralmente considerado mais eficaz na redução dos riscos de recorrência e progressão, mas também é mais tóxico que a quimioterapia intravesical. A escolha entre a quimioterapia ou imunoterapia intravesical depende, portanto, da avaliação individual de cada paciente (JARVINEN *et al.*, 2009; MALMSTRÖM *et al.*, 2009; DUCHEK *et al.*, 2010; SYLVESTER *et al.*, 2010; BABJUK *et al.*, 2019).

Desde a década de 1960, a cistectomia radical tem sido o procedimento padrão mais eficiente para o tratamento de pacientes com CBMI sem sinais radiológicos de metástases (WHITMORE e MARSHALL, 1962). A cistectomia é uma cirurgia que envolve a remoção completa da bexiga urinária, assim como uma linfadenectomia pélvica. Esta cirurgia é sempre acompanhada de prostatectomia em homens ou histerectomia em mulheres (STENZL *et al.*, 2009; VISHNU *et al.*, 2011).

Complicações pós-operatórias englobam de 25 a 62% dos pacientes submetidos à cistectomia radical, das quais destacam-se as trombozes venosas, o linfocele pélvico e a inflamação intestinal (NOVOTNY *et al.*, 2007). A taxa de sobrevida dos pacientes em cinco anos é de 50% e, metade destes pacientes que sobrevivem, acabam posteriormente desenvolvendo metástase (WITJES *et al.*, 2019). Caso o paciente seja elegível, a cistectomia radical pode ser emparelhada com uma outra técnica terapêutica, a quimioterapia sistêmica neoadjuvante. A combinação destes tratamentos chega a aumentar de 5 a 8% a taxa de sobrevida geral dos pacientes (KITAMURA *et al.*, 2014).

O uso da quimioterapia para tratar o câncer disparou por volta da Segunda Guerra Mundial, quando o gás mostarda se mostrou eficaz contra o linfoma. Anos

mais tarde, na década de 1960, descobriu-se que compostos à base de platina são eficazes contra diversos tipos de neoplasias e, desde a década de 1980, estes compostos têm sido os quimioterápicos de escolha para o tratamento sistêmico de CBMI (ALEXANDER, 1947; ROSENBERG *et al.*, 1965; STERNBERG *et al.*, 1985).

A quimioterapia sistêmica neoadjuvante é a quimioterapia administrada antes da cistectomia, geralmente com cisplatina, a fim de diminuir o tamanho do tumor local e erradicar possíveis micrometástases antes da cirurgia. Atualmente, esse método de intervenção deve ser considerado em todos os pacientes com CBMI e tem por desvantagens sua considerável taxa de toxicidade e os efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, ototoxicidade e alterações cardiovasculares (STENZL *et al.*, 2009).

Um outro tipo de modalidade terapêutica antitumoral que vem sendo estudada nos últimos anos é a associação de nanopartículas (NPs) que apresentam a capacidade de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando a via intrínseca de apoptose por intermédio do estresse oxidativo, com a terapia fotodinâmica (TFD) (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2019).

A TFD é um tipo de fotoquimioterapia que tem como princípio a absorção da energia da luz por um fotossensibilizador, o qual transforma a energia física em química, na forma de EROs (DOUGHERTY *et al.*, 1998). Este procedimento requer a utilização de três componentes: um pigmento fotossensível não tóxico, o fotossensibilizador; uma célula ou tecido alvo contendo oxigênio suficiente; e de uma luz visível de baixa intensidade para o tratamento. Uma reação fotoquímica ocorre entre esses três componentes, levando à geração de EROs, agentes citotóxicos que irão promover a destruição da célula ou tecido alvo (WEN *et al.*, 2017).

O sucesso da TFD no câncer de bexiga tem sido atenuado pelo fato do microambiente tumoral apresentar uma baixa concentração de oxigênio. Muitas NPs usadas na TFD são dependentes de oxigênio externo para produzir EROs e isso tem sido uma barreira para o emprego dessa modalidade para o tratamento do câncer de bexiga. Estudos recentes têm buscado empregar NPs que sejam autossuficientes na geração de O₂, a fim de superar a hipóxia no microambiente tumoral (CHENG *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019).

CAPÍTULO 1

PADRÃO DE EXPRESSÃO PROTEICA DA MORTALINA EM TECIDOS TUMORAIS DE BEXIGA INDUZIDOS PELA IMPLANTAÇÃO ORTOTÓPICA SINGÊNICA DE CÉLULAS MB49 E IMPORTÂNCIA DE SUA ATIVIDADE PARA A VIABILIDADE CELULAR, PRINCIPALMENTE EM SITUAÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

RESUMO

PADRÃO DE EXPRESSÃO PROTEICA DA MORTALINA EM TECIDOS TUMORAIS DE BEXIGA INDUZIDOS PELA IMPLANTAÇÃO ORTOTÓPICA SINGÊNICA DE CÉLULAS MB49 E IMPORTÂNCIA DE SUA ATIVIDADE PARA A VIABILIDADE CELULAR, PRINCIPALMENTE EM SITUAÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

As neoplasias malignas originadas na bexiga podem ser consideradas um dos tipos de cânceres mais comuns, entretanto, ainda não há grande avanço nos atuais métodos diagnósticos, de vigilância e de tratamento. Assim, a identificação de marcadores moleculares como potenciais alvos terapêuticos tem sido utilizada para diminuição dos índices de morbidade e mortalidade desta doença. As proteínas de choque térmico mitocondriais, em especial a mtHsp70 (mortalina), têm sido consideradas como promissores alvos moleculares para o tratamento do câncer, pois desempenham um papel fundamental na sobrevivência celular. As Hsp70 são liberadas em resposta ao estresse ambiental, como choque térmico, metais pesados ou estresse oxidativo, e estresse patológico, como lesões ou resposta inflamatória. Estudos demonstram que a mortalina encontra-se superexpressa em tecidos tumorais, desta maneira, sua inibição pode aumentar a sensibilidade das células tumorais a tratamentos quimioterápicos ou imunoterápicos. Mesmo com o grande indicativo dos benefícios da utilização da mortalina como alvo molecular em diversos tipos de neoplasias, ainda não existem muitos estudos voltados para sua caracterização no carcinoma urotelial de bexiga. Deste modo, a avaliação do padrão de expressão proteica da *HSPA9* no câncer urotelial de bexiga, em modelo animal ortotópico singênico, pode ser fundamental para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para este tipo de neoplasia, bem como a investigação de um potencial alvo para imunização, através de seu inibidor MKT-077. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram obtidos e utilizados nos procedimentos de inoculação intravesical de células tumorais da linhagem MB49. O tecido vesical dos animais foi coletado e utilizado para a classificação histológica por coloração com hematoxilina e eosina e para o ensaio de western blot. A investigação *in vitro* do efeito do tratamento com o inibidor específico de mtHsp70, MKT-077, foi realizada através de ensaios de viabilidade por resazurina e de apoptose e necrose por fluorescência, com células MB49 submetidas ou não ao estresse oxidativo. Observou-se que os tecidos vesicais tumorais apresentaram uma superexpressão de mortalina, quando comparados aos tecidos vesicais saudáveis. Após a inibição da mortalina, com o inibidor específico MKT-077, houve uma redução irreversível e de modo dose-dependente, na viabilidade de células tumorais em cultura celular. A viabilidade destas células tumorais tratadas com o inibidor reduziu ainda mais, após submissão ao estresse oxidativo provocado por H₂O₂. Assim, concluímos que a mortalina encontra-se superexpressa em tecidos vesicais tumorais e é fundamental para a sobrevivência dessas células, ainda mais após a exposição das células a um ambiente oxidativo.

Palavras chaves: Câncer de Bexiga; MB49; Proteínas do Choque Térmico; Mortalina.

ABSTRACT

MORTALIN PROTEIN EXPRESSION PATTERN IN BLADDER TUMOR TISSUES INDUCED BY ORTOTOPIC SYNGENIC IMPLANTATION OF MB49 CELLS AND THE IMPORTANCE OF ITS ACTIVITY FOR CELL VIABILITY, MAINLY IN OXIDATIVE STRESS SITUATIONS

Malignant neoplasms originated in the bladder can be considered one of the most common types of cancers, however, there is still no great progress in the current diagnostic, surveillance and treatment methods. Thus, the identification of molecular markers as potential therapeutic targets has been used to decrease the morbidity and mortality rates of this disease. Mitochondrial heat shock proteins, especially mtHsp70 (mortalin), have been considered as promising molecular target for treatment of the cancer, since they play a fundamental role in cell survival. Hsp70 are released in response to environmental stress, such as thermal shock, heavy metals or oxidative stress, and pathological stress, such as injury or inflammatory response. Studies have shown that mortalin is overexpressed in tumor tissues, so its inhibition may increase the sensitivity of tumor cells to chemotherapy or immunotherapy. Even with the great indication of the benefits of using mortalin as a molecular target in several types of neoplasms, there are still not many studies focused on its characterization in bladder urothelial carcinoma. Thus, the evaluation of the protein expression pattern of HSPA9 in urothelial bladder cancer, in a syngeneic orthotopic animal model, may be essential for the development of new therapeutic targets for this type of neoplasia, as well as the investigation of a potential target for immunization through its inhibitor MKT-077. For this, female C57BL/6 mice were obtained and used for the intravesical inoculation procedures of MB49 tumor cell lineage. The vesical tissue of the animals was collected and used for histological classification by staining with hematoxylin and eosin and for the western blot assay. *In vitro* investigation of the effect of treatment with the specific mtHsp70 inhibitor, MKT-077, was carried out through viability assays by resazurin and fluorescence apoptosis and necrosis, with MB49 cells, submitted or not to oxidative stress. It was observed that tumor bladder tissues showed an overexpression of mortalin, when compared to healthy bladder tissues. After the inhibition of mortalin, with the specific inhibitor MKT-077, there was an irreversible and dose-dependent reduction in the viability of tumor cells in cell culture. The viability of these tumor cells treated with the inhibitor reduced further, after being subjected to oxidative stress caused by H₂O₂. Thus, we conclude that mortalin is overexpressed in tumor bladder tissues and is fundamental for the survival of these cells, even more after the exposure of the cells to an oxidative environment.

Keywords: Bladder Cancer; MB49; Heat Shock Proteins; Mortalin.

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. MARCADORES MOLECULARES E O CÂNCER DE BEXIGA

A identificação de marcadores moleculares como potenciais alvos terapêuticos tem sido utilizada para diminuição dos índices de morbidade e mortalidade do câncer de bexiga. A principal vantagem na utilização destes marcadores é que normalmente são detectáveis em fluidos corporais, como a urina, diminuindo a necessidade de procedimentos diagnósticos invasivos (MITRA e COTE, 2010).

O *TP53* é um gene supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossomo 17, que codifica uma fosfoproteína nuclear, a p53, e é o biomarcador mais frequentemente investigado para prever a progressão de CBMI, em que sua mutação está associada à progressão tumoral (SIDRANSKY *et al.*, 1991; MALATS *et al.*, 2005).

A perda de heterozigidade do cromossomo 9 é um importante biomarcador no para CBNMI, sendo associada com até 60% dos casos (KARAM *et al.*, 2008). Por outro lado, a mutação no gene *FGFR3*, localizado no cromossomo, foi considerada um marcador seletivo favorável para o prognóstico positivo câncer de bexiga (VAN RHIJN *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006).

Proteínas como a citoqueratina, survivina, proteína de matriz nuclear número 22 (NMP22) e o antígeno tumoral da bexiga (BTA), também têm sido amplamente estudadas como biomarcadores para o câncer de bexiga (YUTKIN *et al.*, 2010; CHEUNG *et al.*, 2013).

As proteínas de choque térmico (HSPs) também têm sido consideradas como marcadores moleculares de grande potencial para o estudo do câncer, visto que sua expressão pode estar relacionada a diferentes mecanismos, como proliferação celular, diferenciação, invasão, angiogênese, metástase, apoptose e reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imunológico. (CALDERWOOD *et al.*, 2006; ISCHIA e SO, 2013).

Outros estudos demonstraram que as HSPs são vitais para a resistência dos tumores à quimioterapia ou radioterapia e que os níveis circulantes de HSP ou anticorpos *anti-HSP* em pacientes com câncer, podem ser úteis no diagnóstico da doença. (CIOCCA e CALDERWOOD, 2005; ISCHIA e SO, 2013).

3.1.2. PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO

A resposta ao choque térmico foi primeiramente observada em 1962, após o aquecimento inadvertido em um experimento com *Drosophila melanogaster* (RITOSSA, 1962). Os cromossomos destas moscas incharam em determinadas regiões, sendo a aparência inchada conhecida como um sinal de ativação gênica. Anos mais tarde, essas regiões foram analisadas e demonstraram a presença abundante de um grupo de proteínas, que foram posteriormente denominadas proteínas de choque térmico ou HSPs (TISSIÈRES *et al.*, 1974).

Atualmente, as HSPs são classificadas como chaperonas moleculares intracelulares e estão envolvidas em diversos processos de manutenção da homeostase celular, incluindo redobramento estrutural de proteínas deformadas, degradação de proteínas contendo enovelamentos incorretos e irreversíveis, movimento de proteínas através das membranas e regulação gênica (LEPPÄ e SISTONEN, 1997).

Os mecanismos que visam restaurar a homeostase em proteínas foram evolutivamente desenvolvidos como uma resposta frente a exposição das células ao estresse agudo ou crônico. Esse estresse pode resultar no dobramento incorreto e aglomeração de proteínas e a resposta promovida pelas HSPs visam justamente reparar esse tipo de dano às proteínas, restabelecendo as condições normais de crescimento (MORIMOTO e SANTORO, 1998; LARAMIE *et al.*, 2008;).

Além disso, as HSPs estão envolvidas em vários processos biológicos, incluindo o ciclo celular, proliferação celular, diferenciação e regulação das vias apoptóticas dependentes e independentes de caspases (MILARSKI e MORIMOTO, 1986; HANG *et al.*, 1995). Também exercem funções na modulação do sistema imune, dado que atuam na montagem de anticorpos, na apresentação e reconhecimento de antígenos por linfócitos T e de células *natural killers* (células NK) (ISCHIA e SO, 2013).

As chaperonas moleculares são um grupo diverso de proteínas estruturalmente não relacionadas que auxiliam na formação da estrutura proteica correta sem se tornar parte da estrutura final (ELLIS, 1987). As quatro principais famílias de HSPs, denominadas de acordo com a massa aparente de sua subunidade, são a Hsp90, Hsp70, Hsp60 e as pequenas proteínas de choque térmico (Quadro 1).

Quadro 1 – Famílias de proteínas do choque térmico e suas principais funções conhecidas.

HSP (família)	Funções
Hsp90	Participam na diferenciação e maturação celular. Apresentam atividade de chaperona. Auxiliam na estabilidade estrutural das células.
Hsp70	Mantêm a integridade dos componentes celulares. Possuem ação anti-inflamatória. São rapidamente sintetizadas após estresse celular.
Hsp60	Sintetizadas no citoplasma e transportadas para a mitocôndria. Participam na poupança, produção e transporte de proteínas.
Pequenas HSPs	Bloqueiam agregação de proteínas. Possuem habilidade de oligomerização.

Fonte: Adaptado de DRUMMOND *et al.* (2013).

Presentes em diferentes compartimentos celulares, como o núcleo, o citosol e o retículo endoplasmático, as HSPs podem ser encontradas em diversos locais nas células. As HSPs citosólicas, como as da família Hsp90, são as mais comuns e expressas nas células. Todavia, também existe um grande número destas proteínas que podem ser encontradas na região mitocondrial, como a Hsp60 e a Hsp70 (CZARNECKA *et al.*, 2006).

As HSPs mitocondriais desempenham um papel fundamental para a sobrevivência celular, uma vez que a perda da função ou da integridade mitocondrial pode ativar diferentes vias apoptóticas e está relacionada com o surgimento e progressão de doenças como câncer e doenças neurodegenerativas. Destarte, estas chaperonas mitocondriais são consideradas alvos importantes em estudos de cânceres (PARCELLIER *et al.*, 2003; GREEN e KROEMER, 2004).

Células neoplásicas estão em constante estado de estresse proteotóxico, deste modo, o aumento da expressão das HSPs garante uma vantagem evolutiva para o escape do processo de apoptose. Diversos estudos propõem que inibidores de HSPs sejam benéficos no tratamento do câncer de bexiga (ISCHIA e SO, 2013).

A família Hsp70, cujas proteínas variam de 66 a 78kDa, é uma das famílias de HSPs mais estudadas atualmente. As Hsp70 são expressas constitutivamente e

necessárias em todos os momentos para que as células funcionem normalmente, sendo liberadas em resposta ao estresse ambiental, como choque térmico, metais pesados ou estresse oxidativo, e estresse patológico, como lesões ou resposta inflamatória (MILARSKI e MORIMOTO, 1986; JÉRÔME *et al.*, 1993; HANG *et al.*, 1995; LARAMIE *et al.*, 2008).

O acúmulo de Hsp70 no citoplasma é relativo ao grau de estresse celular (MORIMOTO e SANTORO, 1998), conferindo citoproteção, além de atuar como quimiocina extracelular para as células adjacentes. Essas HSPs também atuam para aumentar a fagocitose e a captação de antígenos estranhos, bem como na regulação positiva de moléculas coestimulatórias (DE JONG, 2009).

A inibição específica da expressão de Hsp70 foi correlacionada com a redução do crescimento de células neoplásicas de bexiga humana (BEHNSAWY *et al.*, 2011). Também foi observado que células de câncer de bexiga se tornaram mais suscetíveis ao tratamento com Mitomicina C, após a inibição desta proteína do choque térmico (HE *et al.*, 2005).

Análises prévias conduzidas por nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), demonstraram que a expressão gênica de *HSPA9*, gene codificador da proteína do choque térmico mtHsp70, está significativamente aumentada em tecidos tumorais de bexiga, quando comparados aos tecidos normais, após indução do modelo ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga com células da linhagem MB49 em camundongos C57BL/6. (CASTAÑEDA, 2017).

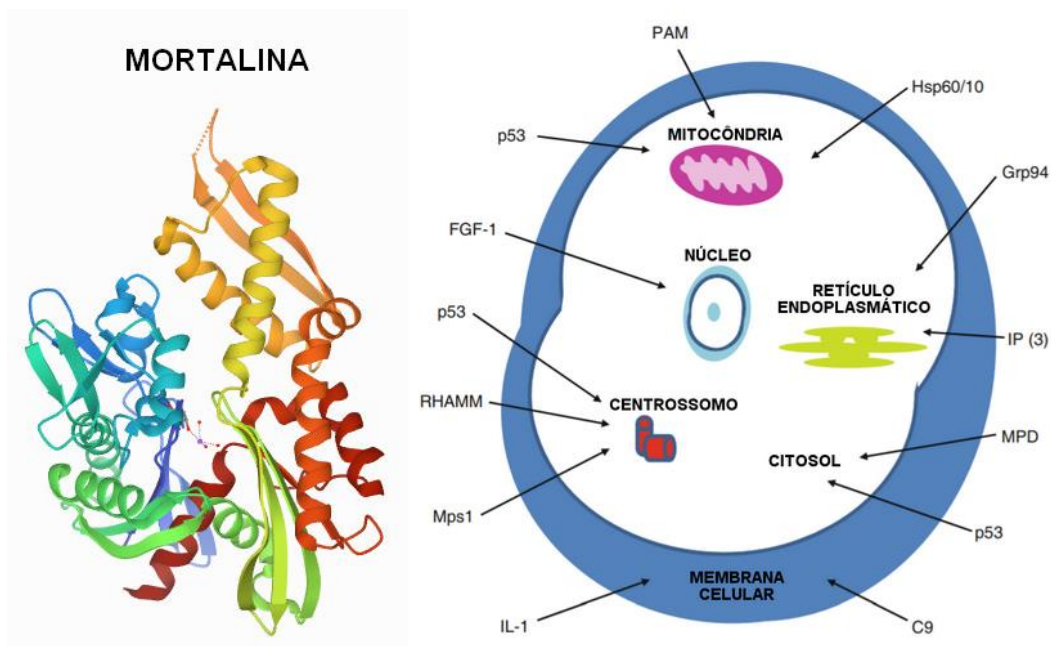
3.1.3. PROTEÍNA MITOCONDRIAL DE CHOQUE TÉRMICO mtHsp70

A proteína de choque térmico mitocondrial mtHsp70, também conhecida como mortalina, é um dos membros da família de proteínas Hsp70 mais estudados, com estudos datando da década de 1980 (CRAIG *et al.*, 1989). Embora a mortalina tenha sido tradicionalmente estudada por seus papéis dentro da mitocôndria, também pode estar presente em vários locais na célula, como no núcleo, retículo endoplasmático, centríolo, membrana celular ou citoplasma (Figura 2) (BASELER *et al.*, 2012).

A mortalina está envolvida em uma série de vias moleculares responsáveis pelo controle da proliferação celular (WADHWA *et al.*, 2002; WADHWA *et al.*, 2003), bem como em diversas outras funções dentro da célula, como o tráfego intracelular,

importação mitocondrial e a própria atividade como chaperona (KAUL *et al.*, 2002). Porém, um de seus mecanismos mais conhecidos é a promoção da carcinogênese, devido à sua interação e posterior inativação transcricional da p53, que, por sua vez, exerce função antiproliferativa em células tumorais (WADHWA *et al.*, 1998).

Figura 2 – Estrutura molecular da mortalina e representação gráfica das inúmeras proteínas e complexos de proteínas que interagem com a mesma em diferentes localizações subcelulares. A ligação da mortalina com inúmeras moléculas extramitocondriais destaca sua multifuncionalidade, que envolve desde a regulação da proliferação celular e a participação na cascata apoptótica, até seu papel como um constituinte do sistema imunológico.



Fonte: Adaptado de BERMAN *et al.* (2000); BASELER *et al.* (2012).

Como descrito anteriormente, os estudos realizados por nosso grupo de pesquisa sugeriram um importante papel da mortalina na sobrevivência da linhagem celular tumoral MB49 (CASTAÑEDA, 2017), indicando um potencial alvo molecular em estudos que busquem desenvolver novas estratégias de tratamento para o câncer de bexiga. Nosso grupo de pesquisa também tem estudado o emprego de NPs que sejam capazes de utilizar o oxigênio da própria nanopartícula, para uso na terapia fotodinâmica. A associação entre essas NPs e um inibidor de mortalina, como o MKT-077, poderia potencializar os efeitos deste tipo de fotoquimioterapia.

Mesmo com diversos estudos indicando a utilização da mortalina como marcador molecular em diversos tipos de neoplasias (NA *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2017; STARENKI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020), ainda não existem muitos trabalhos que

associam sua utilização ao câncer de bexiga. Deste modo, a avaliação do padrão de expressão proteica de mtHsp70 no câncer urotelial de bexiga, bem como da investigação dos efeitos de sua inibição com MKT-077, são fundamentais para o desenvolvimento de um potencial alvo terapêutico para este tipo de neoplasia.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o padrão de expressão proteica da mtHsp70, após indução do modelo murino ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga em camundongos C57BL/6, com células da linhagem MB49, e determinar sua importância para a sobrevivências das células MB49, principalmente em situação de estresse oxidativo.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar possíveis alterações no padrão de expressão proteica da proteína de choque térmico mitocondrial mtHsp70 em tecidos tumorais de bexiga, obtidos por meio do modelo experimental *in vivo*;
- ii. Investigar *in vitro* o efeito do tratamento com o inibidor específico de mtHsp70, MKT-077, na viabilidade de células MB49, submetidas ou não ao estresse oxidativo;
- iii. Analisar o efeito da inibição de mtHsp70 no índice de apoptose, necrose e viabilidade de células MB49, por microscopia de fluorescência.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Sob o registro número 3466140717 (Anexo A) na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), 15 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com peso médio de 20g e sete semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar (DMP/UFSCar).

Os animais permaneceram em adaptação ao novo ambiente por uma semana, antes do início da experimentação, com livre acesso a água filtrada e ração industrial peletizada para roedores. Os alojamentos utilizados foram gaiolas individualmente ventiladas (20 trocas de ar por hora), com 148x143x293 mm (Figura 3), respeitando o limite de cinco animais por gaiola, e fotoperíodo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro, controlado por um temporizador digital.

Figura 3 – Gaiolas individualmente ventiladas para manutenção dos animais no biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.



Fonte: O autor (2020).

Toda a experimentação animal foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar (DGE/UFSCar) e os protocolos experimentais foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa animal adotados pela CEUA/UFSCar.

3.3.2. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

Células tumorais da linhagem MB49, provenientes de carcinoma urotelial de bexiga de camundongos da linhagem C57BL/6, foram cultivadas em meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (DMEM, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil).

A cultura celular foi mantida em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, em garrafas de 75 cm². O crescimento e a aderência das células foram acompanhados diariamente, em microscópio invertido, até a observação de 90% de confluência da monocamada celular (ANDRADE *et al.*, 2010).

As células aderentes foram então removidas da superfície com adição de uma solução com tripsina 2,5% (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a quantificação celular direta, em câmara de Neubauer, realizada com o auxílio da solução de azul de *Trypan* a 0,4% (Life Technologies), em que a integridade celular foi confirmada pelo método de exclusão.

3.3.3. CATETERIZAÇÃO TRANSURETRAL E INDUÇÃO DA LESÃO

Todos os 15 animais foram previamente anestesiados, por via intraperitoneal, com 100 µL de uma solução contendo 90 mg/kg do anestésico geral dissociativo cloridrato de cetamina (Dopalen[®], Ceva, Paulínia, SP, Brasil) e 10 mg/kg do analgésico e sedativo xilazina (Anasedan[®], Ceva). Um algodão foi embebido com soro fisiológico e colocado em contato com os olhos dos animais, evitando ressecamento dos mesmos.

Sob efeito dos anestésicos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à cateterização transuretral com o auxílio de um cateter intravenoso de polietileno de 24 G (0,7x19 mm), sem agulha, e ampla lubrificação com vaselina. Nesta posição, o cateter foi inserido no canal da uretra em um ângulo de 45 graus, passando por baixo do osso púbico até alcançar a bexiga (Figura 4A).

Após o esvaziamento da bexiga, por compressão manual, para a retirada de resíduos de urina, a lesão química do epitélio vesical (adaptado de LUO *et al.*, 2004) foi induzida em todos os animais, por meio de breve exposição à uma substância

cáustica (30 μ L de AgNO_3 , 0,3 M), por 10 segundos. A substância foi então removida através de lavagens com tampão fosfato-salino (NaCl 136,89 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,46 mM; pH 7,4), até que o conteúdo retirado da bexiga apresentou-se translúcido, como descrito por Chade e colaboradores (2008).

Figura 4 – Procedimento de cateterização transuretral e inoculação intravesical em camundongos da linhagem C57BL/6. (A) Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à cateterização transuretral. (B) Após a cateterização e indução da lesão, os animais passaram pelo procedimento de inoculação intravesical e foram mantidos em decúbito dorsal para que o conteúdo instilado permanecesse no interior da bexiga.



Fonte: O autor (2020).

3.3.4. INOCULAÇÃO INTRAVESICAL DE CÉLULAS TUMORAIS

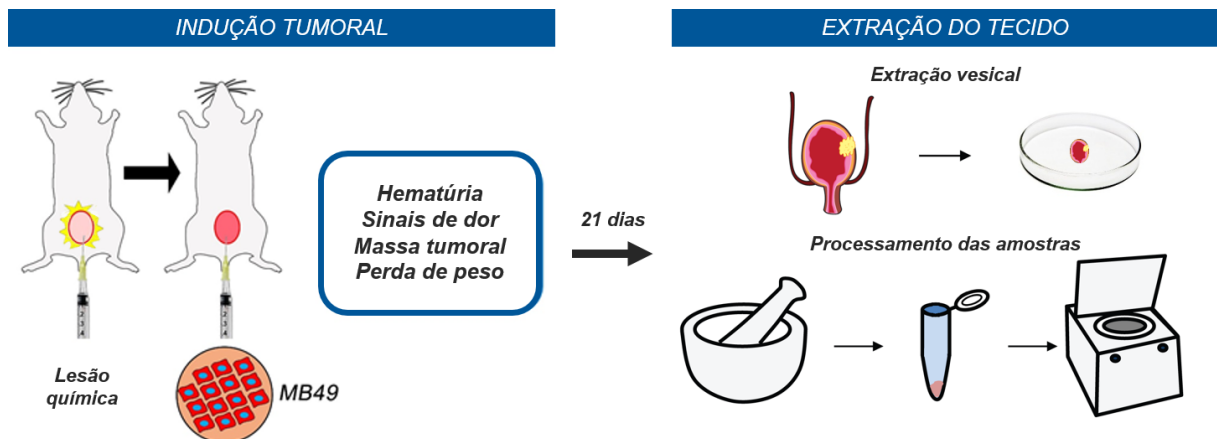
Para posterior análise da expressão proteica da mtHsp70, os camundongos obtidos foram divididos em dois grupos (Figura 5): Grupo A1 (n = 5 animais), com a inoculação intravesical de 100 μ L de tampão fosfato-salino (PBS), sem indução tumoral; Grupo A2 (n = 10 animais), com a inoculação intravesical de 100 μ L de suspensão celular a 1×10^6 células MB49 por camundongo.

Após o procedimento de inoculação intravesical, os animais foram mantidos em decúbito dorsal para que o conteúdo instilado permanecesse no interior da bexiga (Figura 4B) e, cerca de 45 minutos após o início do procedimento de anestesia, os cateteres foram removidos.

O aparecimento de sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral, como hematúria, dor, presença de massa palpável na região pélvica ou diminuição do peso do animal, foi observado diariamente. Após 21 dias, assim que detectado os sintomas

correspondentes ao desenvolvimento tumoral, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados.

Figura 5 – Fluxograma da metodologia de experimentação para indução tumoral e extração de tecido vesical. Os camundongos foram submetidos à indução química da lesão e divididos em dois grupos: Grupo A1 (Sem inoculação de MB49, n = 5); e Grupo A2 (Com a inoculação de MB49, n = 10). Após 21 dias, todos os animais foram eutanasiados e o tecido vesical extraído para avaliação da expressão proteica de mtHsp70.



Fonte: O autor (2020).

3.3.5. EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO VESICAL

Antes do procedimento de extração do tecido vesical (Figura 6), os animais foram eutanasiados por meio de administração via intraperitoneal de sobredosagem da associação de cloridrato de cetamina (270 mg/kg, Dopalen[®], Ceva), um antagonista de receptor N-metilD-aspartato, com xilazina (30 mg/kg, Anasedan[®], Ceva), um agonista de receptor adrenérgico $\alpha 2$ (BRASIL, 2016).

A colheita histopatológica iniciou-se com o exame externo e antissepsia do cadáver. O animal foi fixado à mesa de necropsia, com agulhas posicionadas acima das articulações do carpo e tarso, posicionado em decúbito dorsal e distendido, para expor toda a região ventral do animal (ANDRADE *et al.*, 2002).

Utilizando tesoura cirúrgica, uma incisão longitudinal da pele foi promovida sobre a linha mediana, seguida de uma incisão da musculatura da cavidade abdominal. Uma pinça lisa foi utilizada para suspender o tecido vesical, que foi então colhido com o auxílio de uma tesoura cirúrgica (BRITO *et al.*, 2015).

Após a extração dos tecidos, os cadáveres dos animais foram acondicionados em saco de lixo branco leitoso e armazenados em freezer -80°C até o recolhimento

peelo serviço de coleta de resíduos de serviços de saúde para sua correta disposição final, conforme a legislação vigente.

Figura 6 – Procedimento de extração de amostra vesical de camundongos da linhagem C57BL/6, após eutanásia por sobredosagem de anestésicos.



Fonte: O autor (2020).

3.3.6. TÉCNICA DE COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA

As amostras de tecidos vesicais coletadas foram cortadas ao meio, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, e metade de cada bexiga foi acondicionada em um recipiente com formalina neutra tamponada a 10%, por 16 horas e ao abrigo da luz. Os tecidos fixados foram então lavados com água destilada e transferidos para um tubo contendo álcool 70°, para realização da técnica de coloração por hematoxilina-eosina (HE).

As bexigas foram incluídas em parafina após desidratação com álcool e clarificação com xilol. Após a inclusão e secagem das amostras, foi realizado o corte histológico do material. A coloração por HE iniciou com a desparafinização das lâminas com xilol e posterior hidratação. Após o processo de desparafinização, as lâminas passaram por uma bateria de coloração (hematoxilina de Harris, água

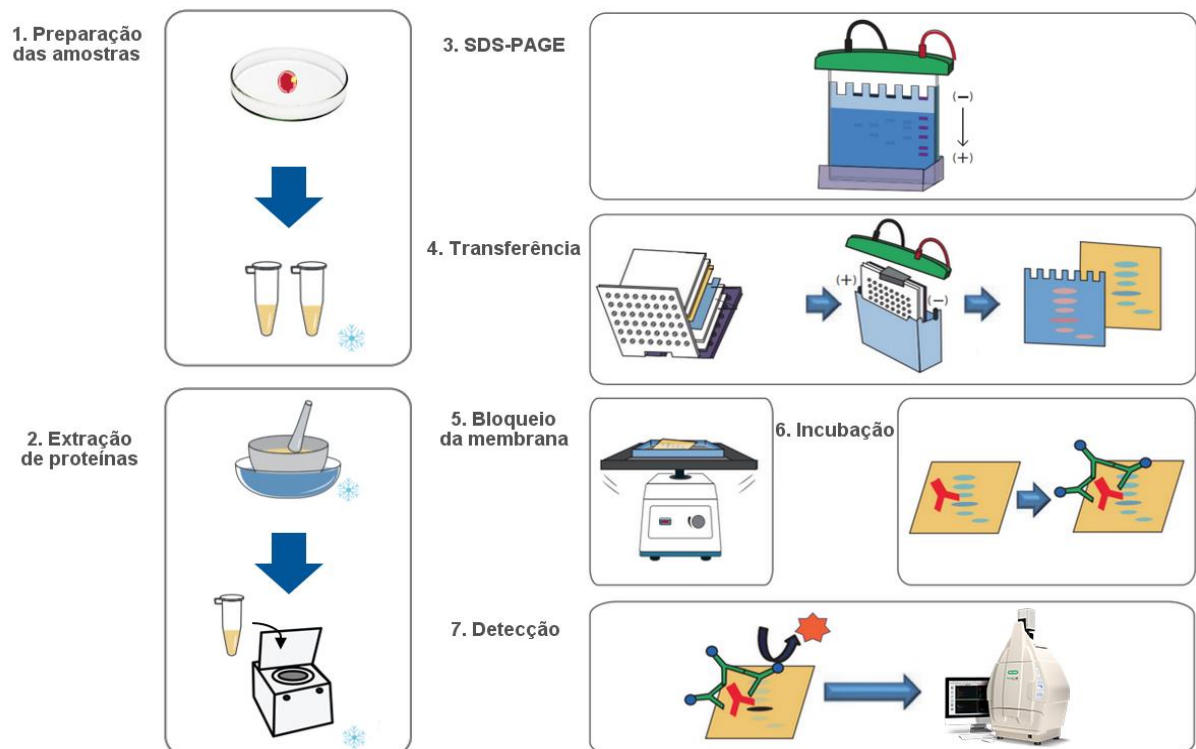
destilada e eosina), bem como por uma nova desidratação com álcool e xilol, sendo montadas sobre a lamínula com bálsamo.

Após 12 horas de secagem, as lâminas estão prontas para o escaneamento, por meio de equipamento próprio para digitalização de lâminas histológicas (Pannoramic Desk® - 3DHitech, Budapeste, Hungria). As imagens obtidas foram visualizadas e quantificadas utilizando o programa Pannoramic Viewer® 1.15.4 (3DHitech, Budapeste, Hungria).

3.3.7. ENSAIO DE *WESTERN BLOTTING*

A outra metade de cada tecido vesical colhido, pertencente aos animais dos grupos A1 e A2, foi imediatamente lavada com PBS, acondicionada em microtubo e mantida sobre gelo. As amostras vesicais foram utilizadas para a verificação da expressão da proteína de choque térmico mitocondrial, mtHsp70, por meio do ensaio de *western blotting* (Figura 7).

Figura 7 – Princípio do ensaio de *western blotting*. O ensaio inicia-se com a preparação e a extração de proteínas das amostras. Após a quantificação, as proteínas são separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é bloqueada e incubada com os anticorpos primários e secundários. Por fim, é feita a detecção da proteína de interesse.



Fonte: Adaptado de JEONG (2018).

3.3.7.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS VESICAIS

A primeira etapa do ensaio de *western blot* é a extração de proteínas, a partir dos tecidos vesicais previamente coletados e processados. As amostras de bexiga foram pesadas, para o cálculo da quantidade de tampão de lise RIPA (Tabela 1) utilizada em cada grama de amostra.

Tabela 1 – Composição do tampão de lise RIPA.

Componentes	Concentração
NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM
Nonidet P-40 (NP-40) ou Triton X-100	1%
Desoxicolato de Sódio (C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄)	0,5%
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	0,1%

Fonte: O autor (2020).

O tampão de lise RIPA foi preparado com pH 8,0 e em conjunto com um coquetel inibidor de proteases e fosfatases (ortovanadato de sódio 0,1%, fluoreto de sódio 0,02% e Sigmafast® 0,01% – Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). As amostras de tecidos foram maceradas em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, até atingirem o ponto de pó. Após a maceração, as amostras foram incubadas em tampão RIPA e mantidas em gelo por todo o período subsequente de experimentação. O homogenato das bexigas foi centrifugado a 16900 x *g* por 20 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C.

3.3.7.2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas totais em cada amostra foi realizada pelo método de Bradford, em que o reagente azul brilhante de *Coomassie G-250* altera a absorbância máxima da solução de 465 para 595 nm (BRADFORD, 1976). Assim, foram pipetados 10 µL de amostra e 190 µL de solução de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), por poço. A microplaca foi envolvida em papel alumínio e incubada por 10 minutos ao abrigo da luz.

A determinação colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Asys UVM 340[®], Biochrom, Cambridge, Reino Unido) no comprimento de onda de 595 nm. A partir da regressão linear, obtida dos valores de absorbância da curva de calibração com 0,0625, 0,125, 0,25 e 0,5 mg/mL de albumina bovina sérica (BSA), a concentração de proteínas totais (em µg/µL) foi determinada para cada amostra.

Com o resultado da quantificação total de proteínas, o fracionamento das amostras foi determinado através da divisão do volume final (30 µL) pela quantidade de proteínas (µg/µL) em cada amostra. As amostras previamente processadas foram diluídas em tampão de amostra de proteína (Tabela 2), suplementado com 0,5% de SDS em condição desnaturante e 10% de β-mercaptoetanol no momento do uso, e posteriormente desnaturadas em ebulidor elétrico à 100°C, durante 5 minutos.

Tabela 2 – Composição do tampão de amostra de proteína.

Componentes	Quantidade (em mL)
Glicerol	5,0
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂) 1M, pH 6,8	3,1
Água destilada	1,4
Azul de bromofenol a 1%	0,5

Fonte: O autor (2020).

3.3.7.3. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-Page) utiliza um sistema vertical para a separação das proteínas (PowerPac[™], Bio-Rad), de acordo com o peso molecular de cada proteína (adaptado de LAEMMLI, 1970). Para isso, foi preparado um gel de separação para a migração das proteínas, com maior concentração de poliacrilamida, e um gel de empilhamento para o depósito das proteínas, com menor concentração de poliacrilamida (Tabela 3).

Após a completa polimerização dos géis de separação e empilhamento, a cuba do sistema de eletroforese foi preenchida com tampão de corrida (glicina 190 mM, tris 25 mM, SDS 0,1%, água destilada, pH 8,8). Com o auxílio de uma micropipeta, 30µl de cada amostra foram aplicadas às canaletas e a solução contendo o marcador

de peso molecular (padrão) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) foi pipetada no primeiro poço à direita. As proteínas foram então separadas através da aplicação de 150 v, por aproximadamente 1 hora.

Tabela 3 – Composição dos géis de empilhamento e de separação.

Componentes	Quantidade por molde (em mL)	
	Gel de empilhamento 5%	Gel de separação 10%
Mix de acrilamida 30% e N,N-metileno-bisacrilamida 0,8%	0,5	1,7
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	1,3 (1,0 M, pH 6,8)	1,3 (1,5 M, pH 8,8)
SDS 10%	0,05	0,05
Persulfato de amônio 10%	0,05	0,05
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	0,002	0,002
Água destilada	2,1	1,9

Fonte: O autor (2020).

3.3.7.4. ELETROTRANSFERÊNCIA EM SISTEMA SUBMERSO

Após a eletroforese, as bandas das proteínas foram transportadas para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um processo denominado borramento (*blotting*), após a aplicação de uma corrente elétrica (TOWBIN *et al.*, 1979). Para tanto, o gel foi retirado do molde de vidro e mergulhado em uma solução tampão de transferência para sistema submerso (glicina 95 mM, tris 12,5 mM, metanol 20%, água destilada, pH 8,3).

A membrana de nitrocelulose foi equilibrada, juntamente com a esponja e o papel filtro (já montados em formato de “sanduíche”), mergulhando-os no tampão de transferência por 20 minutos, em geladeira. Na montagem do “sanduíche” para a transferência, a membrana é colocada em contato com o gel de poliácridamida, o papel filtro envolve os dois e, por fim, a esponja encobre todos os materiais.

O material foi então colocado na cuba do sistema de transferência, juntamente com um pacote plástico de gelo reciclável, uma barra magnética e o tampão de transferência, submergindo totalmente o material. A cuba do sistema de transferência foi colocada em uma caixa térmica, envolvida com gelo e posicionada em agitador

magnético. A caixa térmica foi mantida em geladeira e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, através da aplicação de uma corrente elétrica em cada lado do suporte, estando o cátodo (-) do lado mais próximo ao gel e o ânodo (+) mais próximo à membrana. O sistema de transferência (PowerPac™, Bio-Rad) foi configurado a 150 v, por 1 hora e meia.

3.3.7.5. BLOQUEIO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS

Logo após o término da transferência, a membrana foi retirada do “sanduíche”, lavada rapidamente com água destilada e corada com solução *Ponceau S* (Sigma-Aldrich). A posição da coluna padrão foi marcada e a membrana foi lavada com solução salina tris-tamponada com tween 20 (TTBS) (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição da solução salina tris-tamponada com tween 20.

Componentes	Concentração
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂), pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%

Fonte: O autor (2020).

Ligações não específicas foram minimizadas pela pré-incubação da membrana com solução tampão bloqueadora (Tabela 5), por 2 horas em agitador e à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi novamente lavada com TTBS e acondicionada em geladeira até o momento da incubação com anticorpo primário e secundário.

Tabela 5 – Composição da solução tampão bloqueadora.

Componentes	Concentração
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂) 1M, pH 6,8	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,02%
Leite em pó desnatado	5%

Fonte: O autor (2020).

3.3.7.6. INCUBAÇÃO COM ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

Para a incubação utilizando o método de dois passos, a membrana foi incubada *overnight* em um agitador na geladeira, primeiramente com o anticorpo monoclonal primário *anti-HSP70 rabbit* (Abcam, Cambridge, Reino Unido), em solução com TTBS, BSA 5% e azida sódica (NaN_3). Decorrido o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada com TTBS e incubada durante 1 hora à temperatura ambiente em um agitador, desta vez com o anticorpo secundário conjugado *anti-IgG rabbit* (Abcam), em solução com TTBS e BSA 5%. A membrana de nitrocelulose foi então lavada com TTBS por três vezes, durante 5 minutos cada, em agitador.

3.3.7.7. DETECÇÃO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Para a detecção por quimioluminescência, o *blot* foi revelado utilizando o fotodocumentador ChemiDoc[®] (Bio-Rad). O reagente luminol para *western blotting* SC-2048 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), contendo uma solução A (tris, DMSO, ácido p-cumárico e luminol) e uma solução B (peróxido de hidrogênio), foi preparado e utilizado para a revelação. Após a incubação por 1 minuto no reagente luminol, a membrana foi inserida na bandeja inferior do sistema ChemiDoc[®] e reveladas conforme instruções do fabricante.

Após a revelação do blot para a proteína de interesse, os procedimentos de incubação com anticorpos e detecção quimioluminescente foram repetidos, desta vez com uma marcação para o controle interno, utilizando a proteína estrutural β -actina (anticorpo primário *anti- β -actina mouse*, Cell Signaling Technology, EUA) e o anticorpo secundário *anti-IgG mouse* (KPL, Gaithersburg, MD, EUA).

As densidades relativas das bandas foram determinadas através de análise densitométrica, a partir do cálculo do número e intensidade dos pixels na área estimada do *blot*. Os resultados foram expressos como a razão entre a quantidade de proteína fosforilada, pela quantidade de proteína total correspondente.

3.3.8. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA

Células tumorais da linhagem MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços (1×10^5 células/poço) em quintuplicata, utilizando meio DMEM com alta

concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A microplaca foi incubada *overnight* em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%. Após esse período, o sobrenadante foi removido e as células tratadas por 24 horas com diferentes concentrações (2,5, 5 e 10 µg/mL) de MKT-077 (Sigma-Aldrich), um inibidor específico da proteína do choque térmico mtHsp70. Células cultivadas sem MKT-077 foram consideradas controle negativo.

Após as 24 horas, os sobrenadantes foram descartados e o ensaio de viabilidade celular realizado através da adição de 180 µL de uma solução com meio DMEM (Cultilab) e 70 µM de resazurina (Sigma-Aldrich), em cada poço. A microplaca foi novamente incubada em estufa incubadora e ao abrigo da luz, por 3 horas, a fim de permitir que as células viáveis metabolizassem e reduzissem a resazurina em resorufina (O'BRIEN et al., 2000).

Assim que a solução passou de uma coloração azul para rosa, 150 µL do meio de cada poço foram transferidos para uma outra microplaca de 96 poços. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 570 nm e 600 nm como referência, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340®, Biochrom).

Com a finalidade de verificar o efeito do inibidor MKT-077 no crescimento das células tumorais após a retirada do tratamento, a viabilidade celular também foi avaliada em células MB49 previamente tratadas com o inibidor por 24 horas e cultivadas por 24 horas adicionais (pós-tratamento) com novo meio DMEM (Cultilab), sem MKT-077.

3.3.9. ENSAIO DE COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO (LA/BE)

Para analisar o índice de apoptose, necrose e viabilidade de células MB49, após a inibição de mtHsp70 com diferentes concentrações de MKT-077, foi realizado um ensaio de fluorescência, através do método de marcação dupla diferencial por laranja de acridina e brometo de etídio (LA/BE) (SMITH *et al.*, 2012).

Células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços (5x10⁴ células/poço) em quadruplicata, utilizando meio DMEM com alta concentração de

glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A microplaca foi incubada *overnight* em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5% e, após esse período, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS à temperatura ambiente. As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações (2,5, 5 e 10 µg/mL) do inibidor MKT-077 (Sigma-Aldrich).

Células cultivadas sem MKT-077 foram consideradas controle negativo para apoptose (células viáveis), enquanto que células cultivadas com 10 µM de H₂O₂ pelas mesmas 24 horas foram consideradas controle positivo para apoptose (TREVISOLI, 2018). Também foram avaliadas células MB49 previamente tratadas com o inibidor por 24 horas e cultivadas por 24 horas adicionais, após a retirada do tratamento, com novo meio DMEM (Cultilab), sem MKT-077.

O sobrenadante de cada poço foi delicadamente removido e as células lavadas com PBS à temperatura ambiente. Adicionou-se 30 µL de uma solução de marcação contendo 0,376 mmol/L de laranja de acridina (Sigma-Aldrich) e 0,253 mmol/L de brometo de etídio (Thermo Fisher Scientific), em cada poço. Após 10 minutos, os sobrenadantes foram novamente removidos e as células lavadas com PBS à temperatura ambiente.

Para que não houvesse interferência na análise por fluorescência, foi necessária a utilização de um meio de cultivo sem a presença de vermelho de fenol. Deste modo, um meio DMEM, com alta concentração de glicose e sem vermelho de fenol (Thermo Fisher Scientific), foi adicionado em cada poço. A microplaca foi levada imediatamente para análise em microscópio automático ImageXpress® Micro XLS (Molecular Devices, San José, CA, EUA).

3.3.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA EM AMBIENTE OXIDATIVO

Para a determinação da viabilidade das células tumorais tratadas com o inibidor MKT-077 em ambiente oxidativo, células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços (1x10⁵ células/poço) em quintuplicata, utilizando meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A microplaca foi incubada *overnight* em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5% e, após esse período, o sobrenadante foi removido e as células tratadas por 24 horas com 1 ou 2 µg/mL do inibidor MKT-077 (Sigma-Aldrich).

Após o período de tratamento com MKT-077, todos os poços foram submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂ (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 µM) e incubadas por outras 24 horas. Células cultivadas na ausência de H₂O₂ foram consideradas controle negativo. Células cultivadas na presença do surfactante não iônico Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 0,1% foram consideradas controle de morte celular.

No dia seguinte, os sobrenadantes foram descartados e o ensaio de viabilidade celular com resazurina foi realizado, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 570 nm e 600 nm como referência, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340®, Biochrom).

3.3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

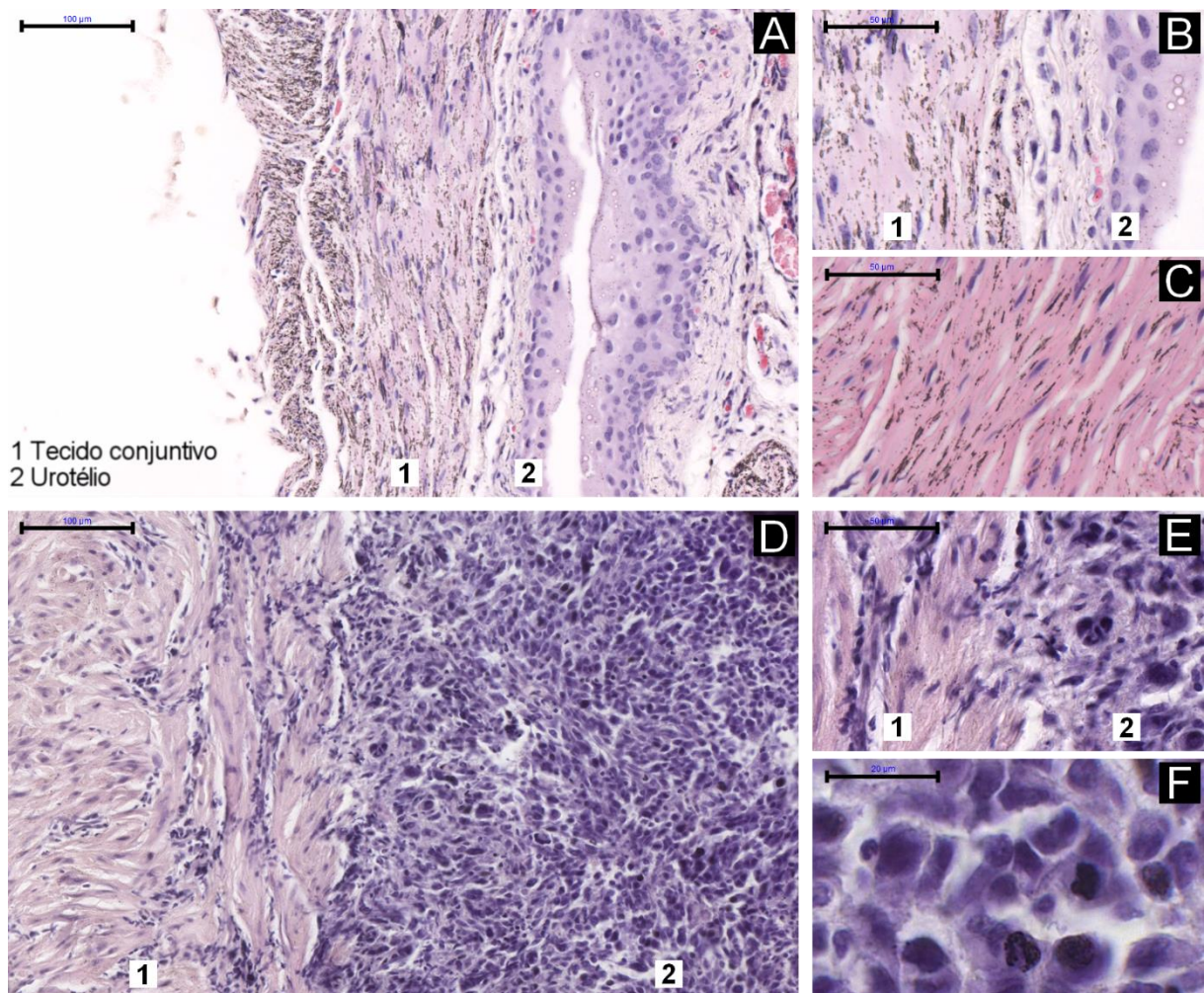
Os dados quantitativos foram estatisticamente analisados utilizando teste T de *Student* ou ANOVA de um fator para a análise de variância, por meio do *software Prism*®, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e, em todas as análises, foram adotados 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO VESICAL TUMORAL

Após a digitalização das lâminas preparadas com os tecidos vesicais e coradas utilizando a técnica de coloração histológica por HE, as imagens das bexigas foram analisadas e caracterizadas histologicamente por meio do programa Panoramic Viewer® 1.15.4 (3DHistech) (Figura 8).

Figura 8 – Análise histológica de tecidos vesicais, corados com hematoxilina e eosina, oriundos de camundongos C57BL/6. (A) Microfotografia de bexiga de animal do grupo sem indução tumoral, apresentando morfologia normal, com ampliação de 20x, barra = 100 µm; (B) 40x, barra = 50 µm; e (C) 100x, barra = 20 µm. (D) Microfotografia de bexiga de animal exposto ao modelo murino de indução singênica e ortotópica de carcinoma urotelial de bexiga, utilizando células MB49, com ampliação de 20x, barra = 100 µm; (E) 40x, barra = 50 µm; e (F) 100x, barra = 20 µm.



Fonte: O autor (2020).

As microfotografias, obtidas por meio da técnica histológica por HE, nos permitem diferenciar o tecido vesical saudável (Figura 8A) do tecido vesical tumoral (Figura 8D). É possível observar as células epiteliais normais sem hiperchromia e células do tecido conjuntivo normais com núcleo oval na Figura 8B. Já nas imagens do tecido tumoral, podemos visualizar o urotélio tumoral hiperchromático e volumoso, cujas células já estão invadindo o tecido conjuntivo (Figura 8E). Assim, podemos caracterizar o tumor induzido como um carcinoma de células transicionais de tecido epitelial vesical, também conhecido como carcinoma urotelial de bexiga (Figura 8F).

3.4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA mtHsp70

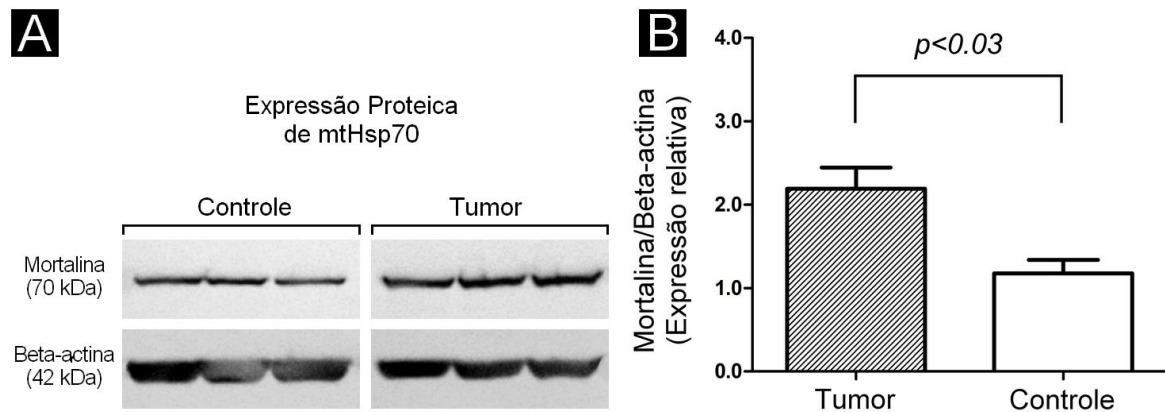
Partindo do pressuposto que o gene *HSPA9*, codificador da mortalina, encontra-se superexpresso em tecidos de bexigas tumorais de camundongos C57BL/6 em comparação a tecidos de bexigas normais (CASTAÑEDA, 2017), a expressão proteica da mortalina foi avaliada, através da realização da técnica de *western blot* em tecidos de bexiga oriundos de camundongos C57BL/6, após a indução do modelo ortotópico e singênico de indução de carcinoma urotelial de bexiga.

O nível de expressão da mortalina nas amostras de bexigas tumorais foi significativamente maior, quando comparado ao nível de expressão proteica nas bexigas saudáveis, corroborando com os resultados prévios de análise de expressão gênica (Figura 9).

A correlação entre expressão alterada de HSPs e resistência à quimioterápicos ou processos de carcinogênese de diversas neoplasias, incluindo carcinoma urotelial de bexiga, tem sido descrita na literatura, através de estudos envolvendo a associação de HSPs da família Hsp70 à sensibilidade ao tratamento e ao desenvolvimento do câncer de bexiga (SYRIGOS *et al.*, 2003; EL-MEGHAWRY EL-KENAWY *et al.*, 2008). A participação da mortalina na apoptose e prevenção do crescimento celular também tem sido observada em estudos envolvendo células malignas da mama, cólon, rim e ovário (WADHWA *et al.*, 2006).

Embora os modelos ortotópicos de indução tumoral sejam ferramentas importantes para a identificação de biomarcadores moleculares e o desenvolvimento de tratamentos antitumorais, a expressão de HSPs ainda não havia sido completamente elucidada, em um modelo ortotópico de indução de tumor de bexiga murino, até o desenvolvimento deste projeto.

Figura 9 – Expressão proteica da mortalina em tumor de bexiga. Os camundongos foram submetidos à indução ortotópica do câncer de bexiga e a expressão da mortalina (mtHsp70) foi determinada por *western blotting*. (A) Representação dos níveis de mtHsp70 (70 kDa) nos homogenatos de tecido de bexiga tumoral em comparação com o tecido de bexiga normal (grupo controle). (B) Nível de expressão de mortalina estimado por análises densitométricas após normalização com beta-actina (42 kDa). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise pelo teste T de *Student* ($n = 3$ camundongos).



Fonte: O autor (2020).

3.4.3. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR APÓS A INIBIÇÃO DA mtHsp70

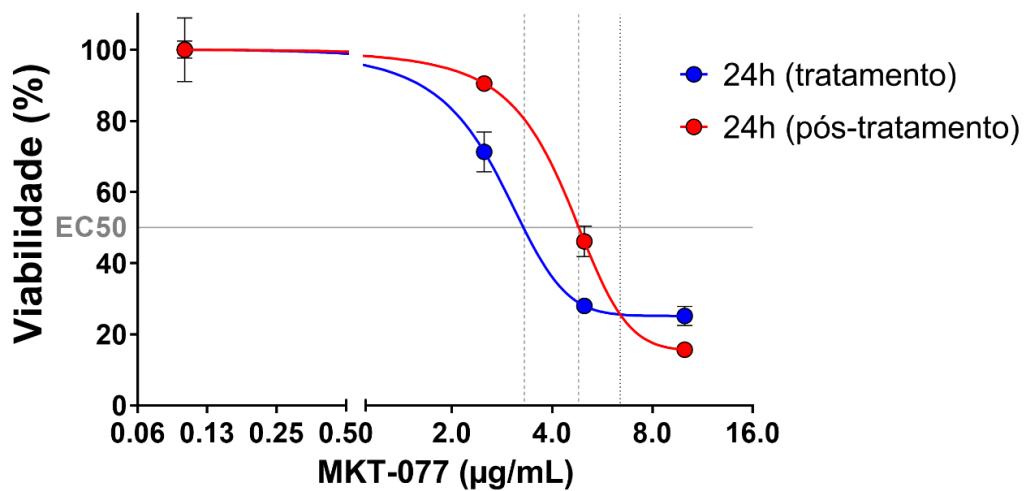
Os resultados da expressão proteica alterada da mortalina em bexigas tumorais podem indicar que essa HSP desempenhe um importante papel na implantação e sobrevivência do câncer de bexiga ortotópico, induzido por células MB49. Assim, o próximo passo no desenvolvimento do projeto foi a observação do comportamento das células MB49 frente a um tratamento com diferentes concentrações do inibidor específico de mortalina MKT-077.

Para isso, o efeito direto e residual do MKT-077 na viabilidade de células MB49 foi analisado *in vitro*, através de um ensaio de resazurina. Os resultados deste ensaio (Figura 10) mostraram uma redução significativa na viabilidade de células MB49 de maneira dose-dependente ($EC_{50} = 3,3 \mu\text{g/mL}$), nas primeiras 24 horas de tratamento com MKT-077. Esse efeito de dose-dependência foi mantido após 24 horas da retirada do tratamento, em que a viabilidade das células tumorais continuou a diminuir significativamente apesar da privação do MKT-077 ($EC_{50} = 4,8 \mu\text{g/mL}$), indicando irreversibilidade do processo, principalmente após o tratamento com concentrações acima de $4 \mu\text{g/mL}$.

O mecanismo mais conhecido da mortalina na promoção da carcinogênese envolve seu papel inibitório na transcrição da p53, que inibe a função antiproliferativa dessa molécula nas células cancerígenas (WADHWA *et al.*, 1998; MA *et al.*, 2006).

Portanto, a ação específica de MKT-077 na atividade de mortalina poderia se basear na liberação de p53 (tipo selvagem) do complexo *p53-mortalin* com o resgate de sua função de ativação transcricional (WADHWA *et al.*, 2000).

Figura 10 – Avaliação da viabilidade das células MB49 após inibição com MKT-077. Curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade das células MB49 após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações do inibidor de mtHsp70 MKT-077, ou cultivadas por 24 horas adicionais sem exposição ao MKT-077 (pós-tratamento). As células foram cultivadas em quintuplicata e a viabilidade foi analisada com resazurina (70 μ M). Os pontos das curvas dose-resposta (coeficiente de determinação, $R^2 > 0,95$) foram expressos como média \pm EPM. As linhas EC_{50} (metade da concentração efetiva máxima) estão identificadas no gráfico como EC_{50} do tratamento = 3,3 e EC_{50} do pós-tratamento = 4,8 μ g/mL de MKT-077.



Fonte: O autor (2020).

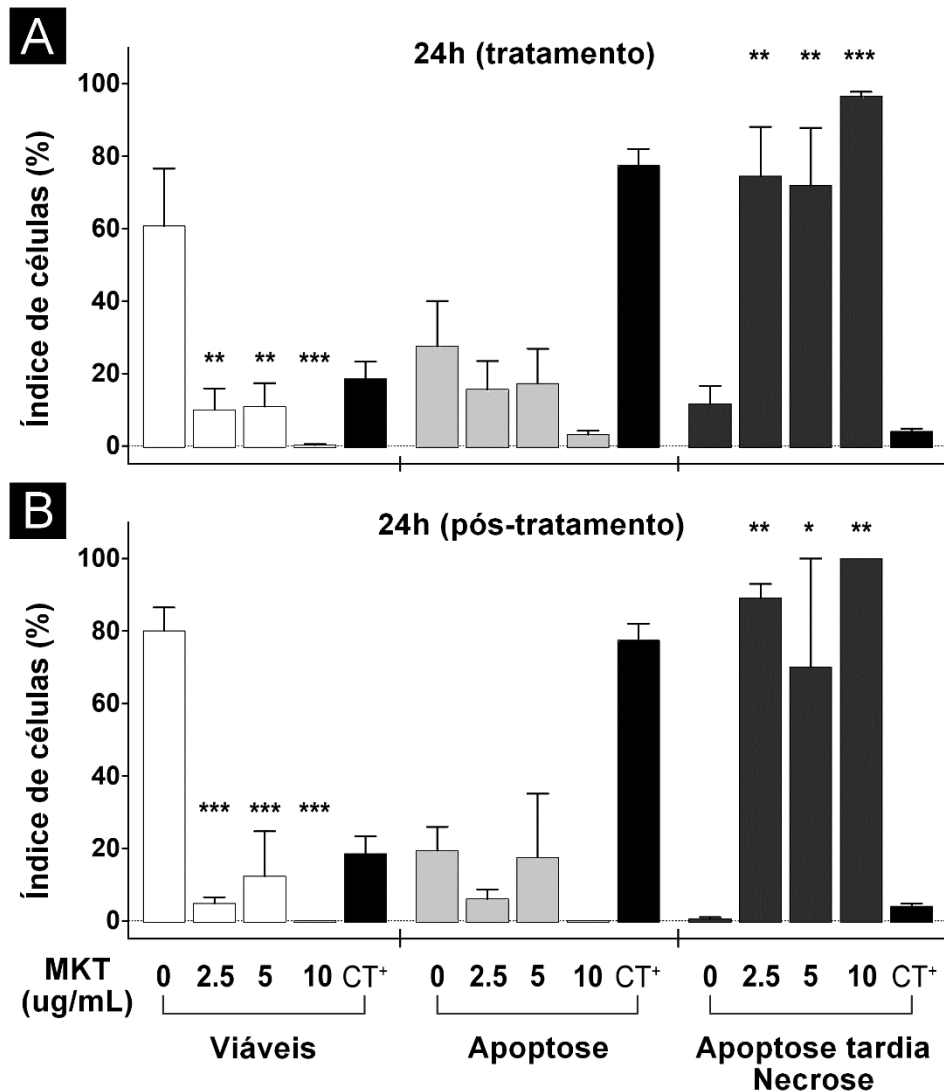
3.4.4. ÍNDICE DE APOPTOSE, NECROSE E VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM MKT-077

Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular com resazurina evidenciam o papel crucial da mortalina na sobrevivência das células do carcinoma da bexiga MB49. Para confirmar o efeito direto do MKT-077 na indução de morte celular, foi realizada uma análise do índice de apoptose e necrose baseada em fluorescência, através do método LA/BE (SMITH *et al.*, 2012).

Observa-se, na Figura 11A, que a viabilidade reduziu significativamente após o tratamento com o inibidor por 24 horas, em todas as concentrações. Também é possível verificar que a taxa de apoptose tardia ou necrose se encontra significativamente elevada em todos os tratamentos, quando comparados ao grupo controle. O perfil de morte celular foi mantido mesmo 24 horas após a retirada do inibidor, em que a viabilidade celular está significativamente reduzida em todos os tratamentos e a taxa

de apoptose tardia ou necrose também está elevada, quando comparada ao grupo controle (Figura 11B).

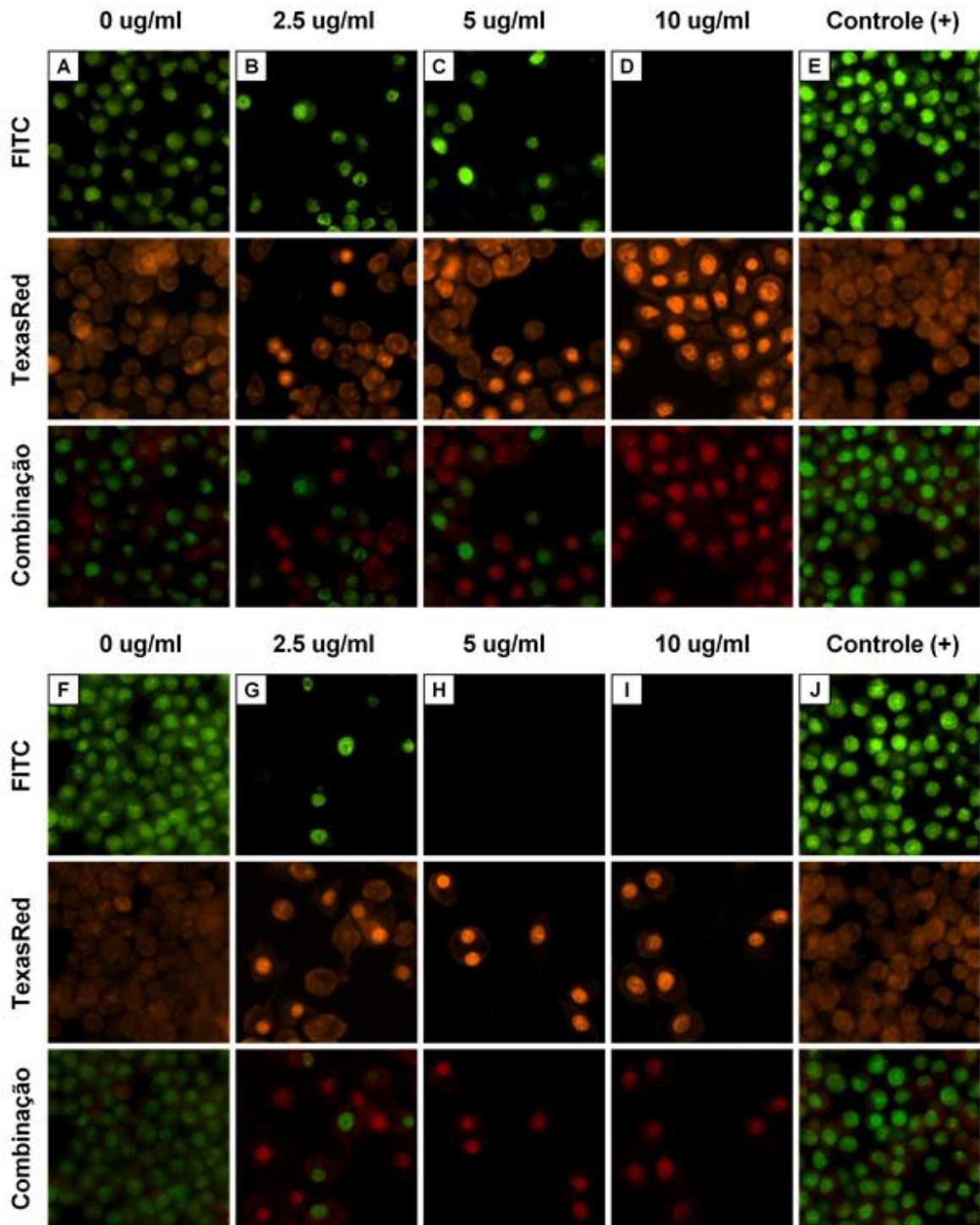
Figura 11 – Índice de células MB49 em apoptose, apoptose tardia ou necrose após exposição a 2,0, 5,0 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ do inibidor MKT-077. (A) As células foram cultivadas em quadruplicata e tratadas com o inibidor por 24 horas. (B) As células foram cultivadas em quadruplicata, tratadas com o inibidor por 24 horas e mantidas em cultura por 24 horas adicionais após a retirada do tratamento. Células cultivadas com 10 μM de H_2O_2 foram consideradas controle positivo para apoptose (CT^+). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de Tukey para comparações *post-hoc* entre os grupos. Asteriscos denotam significância estatística em comparação com células controle.



Fonte: O autor (2020).

Neste experimento de fluorescência com marcação através do método LA/BE também foi possível observar a morfologia das células tumorais após o tratamento com o inibidor MKT-077, bem como diferenciar visualmente o tipo de morte celular (Figura 12).

Figura 12 – Microfotografias representativas do ensaio de morte celular detectados por laranja de acridina e brometo de etídio em células MB49 após 24 horas de exposição ao MKT-077 ou após 24 horas da retirada do tratamento com o inibidor. As células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços e tratadas com MKT-077 em três diferentes concentrações, 2,5 (B), 5,0 (C) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D), por 24 horas. Como controle negativo, as células foram cultivadas na ausência de inibidor (A e F) e, como controle positivo de apoptose, as células foram tratadas com H_2O_2 10 μM (E e J). Células MB49 também foram cultivadas 24 horas após a retirada do tratamento com 2,5 (G), 5,0 (H) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (I). Uma solução contendo laranja de acridina e brometo de etídio foi adicionada em cada poço e a placa foi analisada nos filtros *FITC* e *TexasRed* do equipamento ImageXpress® (400 \times). Cada grupo foi realizado em quadruplicata, apresentando características morfológicas semelhantes.



Fonte: O autor (2020).

Células da linhagem MB49 cultivadas na ausência de MKT-077 apresentaram morfologia normal e fluorescência verde brilhante, sugerindo nenhum sinal de apoptose (Figuras 12A e 12F), enquanto que células cultivadas com H₂O₂ (controle positivo para apoptose) exibiram condensação de cromatina com pontos verdes brilhantes (Figuras 12E e 12J).

Células apoptóticas precoces e tardias, apresentando pontos verdes e pontos laranjas nos núcleos, respectivamente, foram observadas após a exposição às concentrações 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL de MKT-077, por 24 horas (Figuras 12B e 12C). O tratamento com MKT-077 a 10 µg/mL, por 24 horas, resultou na presença de células necróticas, coradas em laranja, sinalizando perda da integridade da membrana celular (Figura 12D).

Para as células MB49 cultivadas após 24 horas da retirada do MKT-077, foram observados sinais de apoptose precoce e tardia na concentração de 2,5 µg/mL (Figura 12G). Com 5,0 µg/mL e 10µg/mL, podem ser observadas células necróticas com alterações na morfologia celular e redução na quantidade de células no poço (Figuras 12H e 12I).

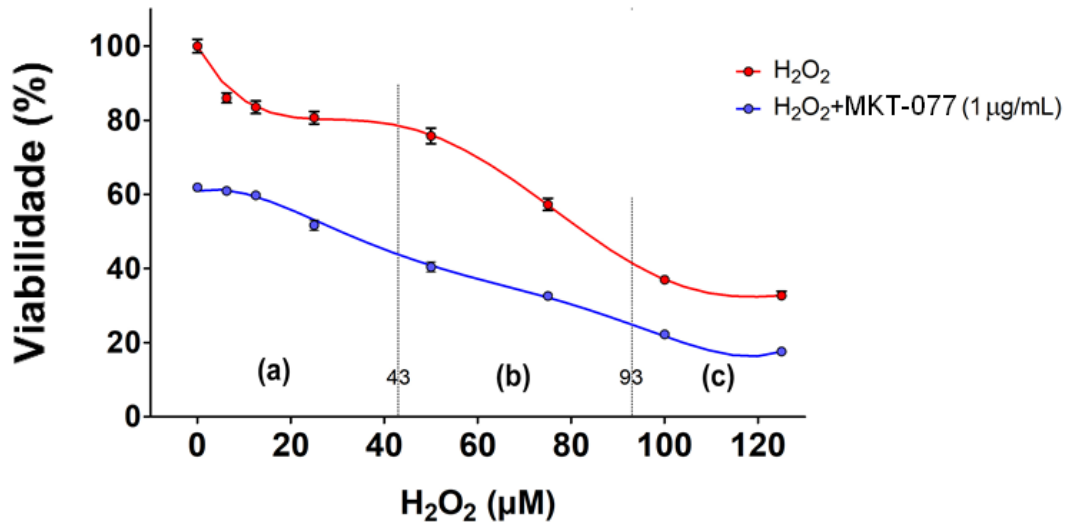
O aumento do número de células apoptóticas e necróticas, 24 horas após a retirada do tratamento, corrobora com o resultado obtido no experimento anterior de viabilidade celular com resazurina, em que houve uma redução significativa na viabilidade das células tumorais pós-tratamento.

3.4.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE DE CÉLULAS MB49 EXPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS TRATAMENTO COM MKT-077

Especula-se que a mortalina, uma das principais chaperonas moleculares mitocondriais, esteja envolvida na resistência celular ao estresse oxidativo (RYU *et al.*, 2014). Para verificar uma possível alteração da resposta de células MB49 ao estresse oxidativo, após a inibição da mortalina, uma curva de viabilidade das células cultivadas na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ foi comparada à viabilidade das células tratadas com MKT-077 e expostas ao H₂O₂ (Figura 13).

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico de dose-resposta, em que é possível observar uma correlação inversa não paramétrica entre viabilidade e concentração de H₂O₂, visualizada pela diferença de relação (inclinação) entre a viabilidade das células previamente inibidas por MKT-077 com as não inibidas.

Figura 13 – Avaliação da viabilidade das células MB49 submetidas ao estresse oxidativo, com diferentes concentrações de H_2O_2 , após inibição prévia com MKT-077. Células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços, em quintuplicata, e tratadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MKT-077 por 24 horas (linha azul). Células não tratadas com MKT-077 foram consideradas controle negativo para inibição (linha vermelha). Após o tratamento, foram expostas a um ambiente oxidativo provocado por H_2O_2 , em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 μM). As curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade celular obtidas por ensaio de resazurina. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM.



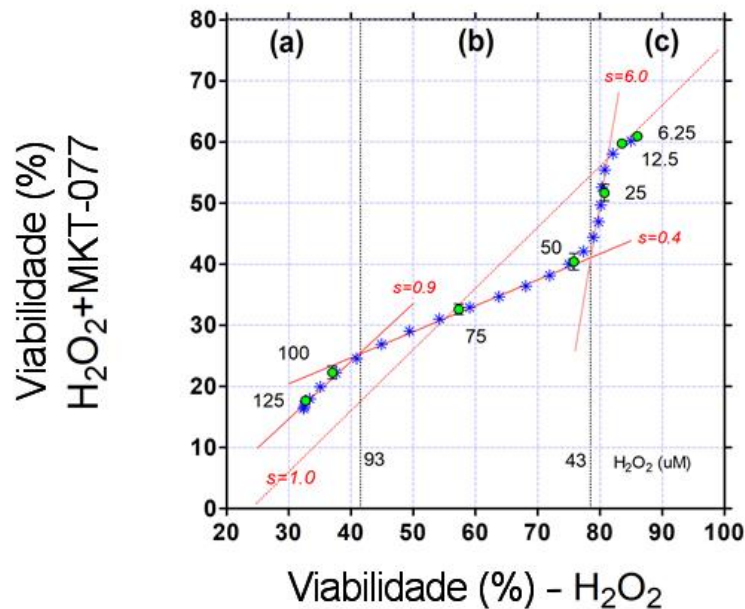
Fonte: O autor (2020).

Estes dados demonstram, portanto, que quando as células MB49 foram tratadas com o inibidor MKT-077 e expostas ao ambiente oxidativo estimulado por diferentes intensidades de H_2O_2 (de 6,25 até 125 μM), a viabilidade foi menor do que no grupo exposto apenas ao H_2O_2 .

Os dados do ensaio de viabilidade por resazurina também foram plotados em um gráfico de dispersão (Figura 14) e mostra que a resistência oxidativa mediada pela mortalina depende da concentração de H_2O_2 . Podemos observar que existem algumas regiões da curva que podem ser ajustadas por uma linha com uma inclinação diferente.

A curva de interação relacionada à concentração de H_2O_2 entre 12,5 μM e 43 μM apresenta uma inclinação de 6,0 (Figura 14C), demonstrando que a velocidade de perda de viabilidade das células MB49 tratadas com o inibidor MKT-077 é maior do que aquelas sem tratamento. Podemos sugerir que a inibição da mortalina reduz a capacidade das células MB49 sobreviverem ao estresse oxidativo gerado pela presença de espécies reativas de oxigênio derivadas do tratamento com H_2O_2 . Também foi observado que em concentrações abaixo de 12,5 μM , não há diferença na velocidade de perda da viabilidade entre os dois grupos.

Figura 14 – Análise da resistência oxidativa mediada por mortalina às células tumorais. Os dados de viabilidade obtidos das células MB49 expostas ao estresse oxidativo e, previamente tratadas com MKT-077, foram comparados aos obtidos das células não tratadas com o inibidor e plotados em um gráfico de dispersão. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM, mostrando relações lineares da viabilidade celular relacionadas à concentração de H_2O_2 e ao tratamento com MKT-077 (1 $\mu g/mL$).



Fonte: O autor (2020).

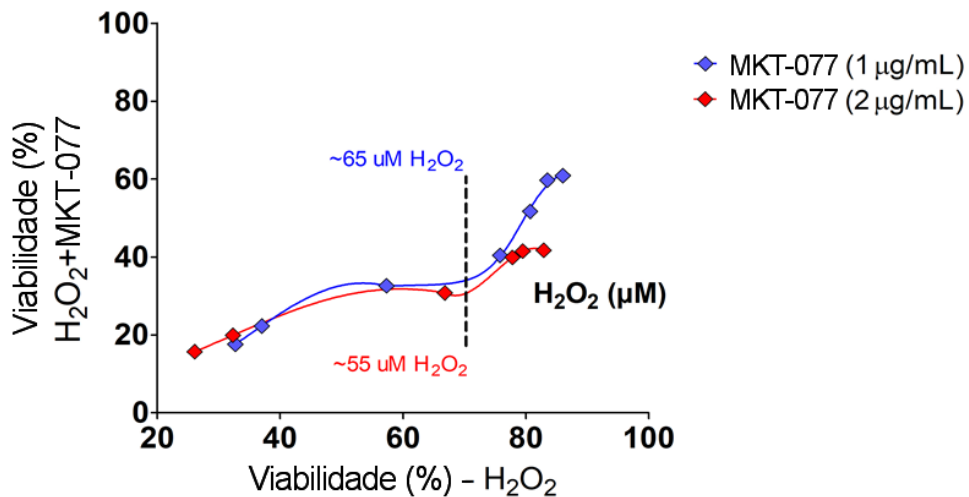
A região relacionada entre 43 μM e 93 μM de H_2O_2 apresentou uma inclinação de 0,4 (Figura 14B), indicando talvez a presença de um efeito seletivo de pressão de MKT-077. Nesta faixa de concentração de H_2O_2 , a célula tratada com MKT-077 por 24 horas teve velocidade de perda de viabilidade menor do que a sem tratamento, possivelmente devido à seleção de clones adaptados ao ambiente oxidativo.

Estudos mostram que células HeLa, derivadas de uma cultura de câncer cervical, cultivadas com 100 μM de H_2O_2 por 24 horas, sobreviveram devido à elevada atividade da enzima catalase, quando comparadas às células cultivadas na ausência de H_2O_2 (PARK, 2014).

A curva de interação relacionada às concentrações de H_2O_2 acima de 93 μM apresentou uma inclinação de 0,9 (Figura 14A), indicando a ausência de qualquer efeito sinérgico do inibidor MKT-077 sobre as células MB49, pois a intensidade do estresse oxidativo é suficientemente alta para sobrecarregar qualquer mecanismo antioxidativo que possa proteger as células tumorais de efeitos deletérios causados pela alta produção de EROs. Nesta faixa de concentração de H_2O_2 , o efeito do tratamento MKT-077 foi irrelevante em termos de sinergismo.

O mesmo padrão de resposta das células tumorais da linhagem MB49 frente ao estresse oxidativo gerado pelas mesmas concentrações de H_2O_2 (6,25 a 125 mM) foi encontrado quando o tratamento com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do inibidor de mortalina foi empregado (Figura 15).

Figura 15 – Comparação das curvas de viabilidade das células MB49 submetidas ao estresse oxidativo, com diferentes concentrações de H_2O_2 , após inibição prévia com 1 ou 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MKT-077. Células MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços, em quintuplicata, e tratadas com 1 ou 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MKT-077 por 24 horas. Após o tratamento, foram expostas ao estresse oxidativo provocado por diferentes concentrações de H_2O_2 (6,25, 12,5, 25, 50, 75, 100 e 125 mM). As curvas de dose-resposta mostram os resultados da viabilidade celular obtidas por ensaio de resazurina. Os pontos das curvas dose-resposta foram expressos como média \pm EPM.



Fonte: O autor (2020).

Deste modo, é possível supor que a mortalina pode favorecer a alguma grau de indução de resistência na linhagem celular MB49 dependendo do nível de estresse oxidativo. Além disso, pode-se supor que a combinação de inibidores de mortalina associados a compostos que induzam o estresse oxidativo, como a terapia fotodinâmica ou nanopartículas possam melhorar a resposta ao tratamento antitumoral.

3.5. CONCLUSÕES

A mortalina encontra-se superexpressa em tecidos vesicais oriundos de camundongos induzidos com o modelo ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga, por meio de células da linhagem MB49. O inibidor específico de mortalina MKT-077 reduz irreversivelmente, e de modo dose-dependente, a viabilidade de células tumorais da linhagem MB49, promovendo o aumento nos índices de apoptose e necrose destas células. A viabilidade destas células tumorais tratadas com o inibidor reduziu ainda mais, após submissão ao estresse oxidativo provocado por H₂O₂.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: Criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.

ANDRADE, P. M.; CHADE, D. C, BORRA, R. C. *et al.* **The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer**. *Urologic Oncology*, v. 28, n. 5, p. 520-525, 2010.

BASELER, W. A.; CROSTON, T. L.; HOLLANDER J. M. Functional Characteristics of Mortalin. *In*: Kaul, S.; Wadhwa, R. Editores. **Mortalin Biology: Life, Stress and Death**. Dordrecht: Springer, 2012. p.55-80.

BEHNSAWY, H. M.; MIYAKE, H.; KUSUDA, Y. *et al.* **Small interfering RNA targeting heat shock protein 70 enhances chemosensitivity in human bladder cancer cells**. *Urologic oncology*, v. 31, n. 6, p. 843-848, 2011.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z. *et al.* **The Protein Data Bank**. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n.1, p. 235-242, 2000.

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

BRASIL. **Resolução Normativa nº 33 do CONCEA, de 18 de novembro de 2016**. Dispõe sobre roedores e lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. *Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF*, p. 5, 21 nov. 2016.

BRITO, E. S. A.; MATOS, M. P. C.; MOURA, V. M. B. D. de. **Caderno técnico: O passo a passo da colheita e remessa de material para exame histopatológico**. Goiânia: Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Goiás, 2015. 4p.

CALDERWOOD, S. K.; KHALEQUE, M. A.; SAWYER, D. B. *et al.* **Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis**. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, n. 3, p. 164-172, 2006.

CASTAÑEDA, E. D. **Expressão gênica de proteínas de choque térmico (HSPs) citoplasmáticas e mitocondriais em modelo ortotópico de câncer urotelial de bexiga.** 2017. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CHADE, D. C.; ANDRADE, P. M.; BORRA, R. C. *et al.* **Histopathological characterization of a syngeneic orthotopic murine bladder cancer model.** International Brazilian Journal of Urology, v. 34, n. 2, p. 220-229, 2008.

CHEUNG, G.; SAHAI, A.; BILLIA, M. *et al.* **Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer.** BMC Medicine, v. 11, p. 13, 2013.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. **Heat shock proteins in cancer : diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.** Cell Stress and Chaperones, v. 10, n. 2, p. 86-103, 2005.

CRAIG, E. A.; KRAMER, J.; SHILLING, J. *et al.* **SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein.** Molecular and Cellular Biology, v. 9, n. 7, p. 3000-3008, 1989.

CUI, X.; LI, Z.; PIAO, J. *et al.* **Mortalin expression in pancreatic cancer and its clinical and prognostic significance.** Human Pathology, v. 64, p. 171-178, 2017.

CZARNECKA, A. M.; CAMPANELLA, C.; ZUMMO, G. **Mitochondrial chaperones in cancer: From molecular biology to clinical diagnostics.** Cancer Biology & Therapy, v. 5, n. 7, p. 714-720, 2006.

DE JONG, P. R.; SCHADENBERG, A. W.; JANSEN, N. J. *et al.* **Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects.** Cell Stress Chaperones, v. 14, n. 2, p. 117-131, 2009.

ELLIS, J. **Proteins as molecular chaperones.** Nature, v. 328, n. 6129, p. 378-379, 1987.

EL-MEGHAWRY EL-KENAWY, A.; EL-KOTT, A. F.; HASAN, M. S. **Heat shock protein expression independently predicts survival outcome in schistosomiasis-**

associated urinary bladder cancer. The International Journal of Biological Markers, v. 23, n. 4, p. 214-218, 2008.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. **The pathophysiology of mitochondrial cell death.** Science, v. 305, n. 5684, p. 626-629, 2004.

HANG, H.; HE, L.; FOX, M. H. **Cell cycle variation of Hsp70 levels in HeLa cells at 37 degrees C and after a heat shock.** Journal of Cellular Physiology, v. 165, n. 2, p. 367-375, 1995.

HE, L.; GUAN, K. P.; YAN, Z. *et al.* **Enhanced sensitivity to mitomycin C by abating heat shock protein 70 expression in human bladder cancer cell line BIU-87.** Chinese Medical Journal, v. 118, n. 23, p. 1965-1972, 2005.

HERNÁNDEZ, S.; LÓPEZ-KNOWLES, E.; LLORETA, J. *et al.* **Prospective study of FDFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas.** Journal of Clinical Oncology, v. 24, n. 22, p. 3664-3671, 2006.

ISCHIA, J.; SO, A. I. **The role of heat shock proteins in bladder cancer.** Nature Reviews Urology, v. 10, n. 7, p. 386-395, 2013.

JEONG, D.; LEE, Y.; LEE, S. V. Western blot analysis of *C. elegans* proteins. *In:* HUANG, L. E. Editor. **Hypoxia: Methods and protocols.** New York: Humana Press, 2018. v.1742, p. 213-225.

JÉRÔME, V.; VOURECH, C.; BAULIEU, E. E. *et al.* **Cell cycle regulation of the chicken hsp90 alpha expression.** Experimental Cell Research, v. 205, n. 1, p. 44-51, 1993.

KARAM, J. A.; SHARIAT, S. F.; HSIEH, J. T. *et al.* **Genomics: a preview of genomic medicine.** BJU International, v. 102, n. 9, p. 1221-1227, 2008.

KAUL, S. C.; TAIRA, K.; PEREIRA-SMITH, O. M. *et al.* **Mortalin: present and prospective.** Experimental Gerontology, v. 37, n. 10-11, p. 1157-1164, 2002.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARAMIE, J. M.; CHUNG, T. P.; BROWNSTEIN, B. *et al.* **Transcriptional profiles of human epithelial cells in response to heat: computational evidence for novel heat shock proteins.** *Shock*, v. 29, n. 5, p. 623-630, 2008.

LEPPÄ, S.; SISTONEN, L. **Heat shock response – Pathophysiological implications.** *Annals of Medicine*, v. 29, n. 1, p. 73-78, 1997.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. **Use of prostate specific antigen to measure bladder tumor growth in a mouse orthotopic model.** *The Journal of Urology*, v. 172, n. 6, p. 2414-2420, 2004.

MA, Z.; IZUMI, H.; KANAI, M. *et al.* **Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53.** *Oncogene*, v.25, n. 39, p.5377-5390, 2006.

MALATS, N.; BUSTOS, A.; NASCIMENTO, C. M. *et al.* **P53 as a prognostic marker for bladder cancer: A meta-analysis and review.** *The Lancet Oncology*, v. 6, n. 9, p. 678-686, 2005.

MILARSKI, K. L.; MORIMOTO, R. I. **Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, n. 24, p. 9517-9521, 1986.

MITRA, A. P.; COTE, R. J. **Molecular screening for bladder cancer: progress and potential.** *Nature Reviews Urology*, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2010.

MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. **Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection.** *Nature Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 833-838, 1998.

NA, Y.; KAUL, S. C.; RYU, J. *et al.* **Stress chaperone mortalin contributes to epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis.** *Cancer Research*, v. 76, n. 9, p. 2754-2765, 2016.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. *et al.* **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PARCELLIER, A.; GURBUXANI, S.; SCHMITT, E. *et al.* **Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 304, n. 3, p. 505-512, 2003.

PARK, W. H. **Anti-apoptotic effect of caspase inhibitors on H₂O₂-treated HeLa cells through early suppression of its oxidative stress.** Oncology Reports, v. 31, n. 5, p. 2413-2421, 2014.

RITOSSA, F. A. **New puffing pattern induced by temperature shock and dinitrophenol in Drosophila.** Experientia, v. 18, p. 571-573, 1962.

RYU, J.; KAUL, Z.; YOON, A. R. *et al.* **Identification and functional characterization of nuclear mortalin in human carcinogenesis.** The Journal of Biological Chemistry, v. 289, n. 36, p. 24832-24844, 2014.

SIDRANSKY, D.; VON ESCHENBACK, A.; TSAJ, Y. C. *et al.* **Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples.** Science, v. 252, n. 5006, p. 706-709, 1991.

SMITH, S. M.; RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *In:* CONN, M. P. Editor. **Laboratory Methods in Cell Biology**, 2012, p. 361-368.

STARENKI, D.; SOSONKINA, N.; HONG, S. K. *et al.* **Mortalin (GRP75/HSPA9) promotes survival and proliferation of thyroid carcinoma cells.** International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 9, p. 2069, 2019.

SYRIGOS, K. N.; HARRINGTON, K. J.; KARAYIANNAKIS, A. J. *et al.* **Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer.** Urology, v. 61, n. 3, p. 677-680, 2003.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H. K.; TRACY, U. M. **Protein synthesis in salivary glands of drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs.** Journal of Molecular Biology, v. 84, n. 3, p. 389-398, 1974.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TREVISOLI, P. G. M. **Comparação da capacidade de formulações medicamentosas de diferentes quimioterápicos em induzir morte celular em células da linhagem MB49 de tumor de bexiga murino.** 2018. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

VAN RHIJN, B. W.; VIS, A. N.; VAN DER KWAST, T. H. *et al.* **Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome.** Journal of Clinical Oncology, v. 21, n. 10, p. 1912-1921, 2003.

WADHWA, R.; TAKANO, S.; ROBERT, M. *et al.* **Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member.** Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 45, p. 29586-29591, 1998.

WADHWA, R.; SUGIHARA, T.; YOSHIDA, A. *et al.* **Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function.** Cancer Research, v. 60, n. 24, p. 6818-6821, 2000.

WADHWA, R.; TAIRA, K.; KAUL, S. C. **An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?.** Cell Stress Chaperones, v. 7, n. 3, p. 309-316, 2002.

WADHWA, R.; YAGUCHI, T.; HASAN, M. K. *et al.* **Mortalin-MPD (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 302, n. 4, p. 735-742, 2003.

WADHWA, R.; TAKANO, S.; KAUR, K. *et al.* **Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis.** International Journal of Cancer, v. 118, n. 12, p. 2973-2980, 2006.

XU, M.; ZHANG, Y.; CUI, M. *et al.* **Mortalin contributes to colorectal cancer by promoting proliferation and epithelial-mesenchymal transition.** IUBMB Life, v. 72, n. 4, p. 771-781, 2020.

YUTKIN, V.; NISMAN, B.; PODE, D. **Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance?** Expert Review of Anticancer Therapy, v. 10, n. 6, p. 787-790, 2010.

CAPÍTULO 2

ESTABELECIMENTO DE MODELO MURINO PARA INDUÇÃO TUMORAL DE
CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA, UTILIZANDO UM SISTEMA DE
LIBERAÇÃO COM GEL POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL

RESUMO

ESTABELECIMENTO DE MODELO MURINO PARA INDUÇÃO TUMORAL DE CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA, UTILIZANDO UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO COM GEL POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL

Estima-se que mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer anualmente. O câncer de bexiga é considerado o 6º câncer de ocorrência mais comum entre homens e o 17º entre mulheres. Contudo, as altas taxas de progressão, recorrência e mortalidade faz com que essa doença tenha um grande peso para o sistema de saúde pública, já que o tratamento dessa doença ainda é considerado pouco eficaz. O desenvolvimento de novos métodos de tratamento está ligado à utilização de modelos experimentais murinos, como o modelo de indução tumoral ortotópico e singênico, utilizando células da linhagem MB49 em camundongos C57BL/6. Apesar da existência de diversos modelos de indução de câncer de bexiga em animais, a taxa de sucesso é altamente heterogênea, variando entre 30% a 100%. Uma alternativa para os métodos convencionais de instilação vesical das células tumorais seria a presença de um sistema de liberação que aumentasse o tempo de contato dessas células com a mucosa do animal. Géis termorreversíveis para a aplicação intravesical são interessantes como sistemas de liberação por sua fácil administração, uma vez que são líquidos à temperatura ambiente e gelificam à temperatura fisiológica, favorecendo o tempo de permanência do composto no local de ação. Assim, o presente estudo teve por objetivo estabelecer um novo modelo murino de câncer urotelial de bexiga, induzido por células da linhagem MB49, na presença de um gel polimérico termorreversível (TPG). Também foi modificada a técnica de indução da lesão no epitélio vesical. A capacidade das células MB49 sobreviverem na matriz de TPG foi avaliada *in vitro* por meio da quantificação da viabilidade, morfologia, proliferação e formação de colônias de células MB49. Para isso, camundongos C57BL/6 passaram pelo procedimento de anestesia, cateterização intravesical e indução da lesão. Os animais foram então divididos em três grupos: Grupo TPG+MB49, Grupo MB49 e Grupo TPG. Os resultados mostraram que a administração do TPG não produziu nenhum efeito adverso aos animais, porém, surpreendentemente, a utilização do gel termorreversível promoveu uma taxa de sobrevivência de 100% nos animais ao impedir o desenvolvimento tumoral. A utilização da indução mecânica da lesão se mostrou superior à utilização da indução química da lesão por restringir o ponto de inoculação ao local do trauma e evitar o espalhamento que ocorre quando a lesão é provocada pelo método químico. Isso pode favorecer a formação de grupos com desenvolvimento de tumores mais homogêneos. A viabilidade e a capacidade de formação de colônias das células tumorais MB49 foi reduzida significativamente após a exposição ao TPG. Deste modo, podemos concluir que o a matriz de TPG diminuiu a viabilidade e capacidade de proliferação das células MB49 e, quando inoculada na bexiga dos animais, bloqueou a indução tumoral.

Palavras chaves: Câncer de Bexiga; MB49; Indução Tumoral; Sistema de Liberação.

ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF A MURINE MODEL FOR TUMOR INDUCTION OF BLADDER UROTELIAL CARCINOMA, USING A RELEASE SYSTEM WITH THERMORREVERSIBLE POLYMERIC GEL

It is estimated that more than 11 million people are diagnosed with cancer annually. Bladder cancer is considered the 6th most common cancer among men and 17th among women. However, the high rates of progression, recurrence and mortality mean that this disease has a great weight for the public health system, since the treatment of this disease is still considered ineffective. The development of new treatment methods is linked to the use of experimental murine models, such as the orthotopic and syngeneic tumor induction model, using MB49 lineage cells in C57BL/6 mice. Despite the existence of several models of bladder cancer induction in animals, the success rate is highly heterogeneous, ranging from 30% to 100%. An alternative to conventional methods of bladder instillation of tumor cells would be the presence of a release system that increases the contact time of these cells with the animal's mucosa. Thermoreversible gels for intravesical application are interesting as delivery systems for their easy administration, since they are liquid at room temperature and gel at physiological temperature, favoring the time the compound remains at the site of action. Thus, the present study aimed to establish a new murine model of bladder urothelial cancer, induced by MB49 lineage cells, in the presence of a thermoreversible polymeric gel (TPG). The lesion induction technique in the bladder epithelium was also modified. The ability of MB49 cells to survive in the TPG matrix was evaluated *in vitro* by quantifying the viability, morphology, proliferation and colony formation of MB49 cells. For this, C57BL/6 mice underwent anesthesia, intravesical catheterization and lesion induction. The animals were then divided into three groups: Group TPG+MB49, Group MB49 and Group TPG. The results showed that the administration of TPG did not produce any adverse effect on the animals, however, surprisingly, the use of the TPG promoted a survival rate of 100% in the animals by preventing tumor development. The use of mechanical injury induction proved to be superior to the use of chemical injury induction because it restricts the inoculation point to the trauma site and prevents the spreading that occurs when the injury is caused by the chemical method. This can favor the formation of groups with the development of more homogeneous tumors. The viability and colony forming capacity of MB49 tumor cells was significantly reduced after exposure to TPG. Thus, we can conclude that the TPG matrix decreased the viability and proliferation capacity of MB49 cells and, when inoculated in the murine urinary bladder, blocked the tumor induction.

Keywords: Bladder Cancer; MB49; Tumor Induction; Release System.

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Estima-se que, em todo o mundo, o número de animais empregados atualmente, para utilização no ensino ou em experimentos científicos, supere algumas dezenas de milhões por ano (ALVES e COLLI, 2006). Nos últimos anos, as discussões a respeito das questões éticas e legais que envolvem a utilização de animais em pesquisas científicas têm aumentado. Com isso, a busca de novos instrumentos e técnicas para a limitação e orientação destas intervenções sobre esses seres, também tem sido cada vez mais frequente (GARRAFA, 2001).

Deste modo, a reavaliação da utilização de animais em pesquisas é tendência mundial, tendo início a partir do surgimento de diretrizes conhecidas internacionalmente como os '3 Rs' (do inglês: *Reduction* ou redução; *Refinement* ou refinamento; e *Replacement* ou substituição). Propostas em 1959, essas diretrizes objetivam, além da redução do número de animais utilizados para pesquisa, refinar o experimento para se certificar que o animal sofra o mínimo possível e buscar alternativas ao uso por outras metodologias, sempre que possível (RUSSELL e BURCH, 1992; STEPHENS *et al.*, 2001).

A experimentação animal, quando realizada de maneira consciente e responsável em procedimentos pré-clínicos, é fundamental na pesquisa científica, principalmente para o desenvolvimento de medicamentos, como quimioterápicos, anestésicos, antibióticos, entre outros. A experimentação prévia em animais também é imprescindível para estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas, de procedimentos, como transplantes, transfusão de sangue, e também para o desenvolvimento de novas modalidades de tratamentos para diversos tipos de enfermidades que acometem a humanidade, como asma, diabetes, leucemia, câncer e outras doenças (ALVES e COLLI, 2006).

4.1.2. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NO ESTUDO DO CÂNCER

Dentre as doenças estudadas com o auxílio de animais de laboratório, pesquisas envolvendo o uso de animais para o estudo do câncer têm se tornado cada vez mais frequentes nas últimas décadas. Em 1979, Summerhayes e Frank

desenvolveram a linhagem celular MB49 a partir de um tumor induzido com o composto 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) no epitélio de bexiga de camundongos C57BL/6. Com o trabalho de Schackert, em 1989, foi desenvolvido um modelo animal para o estudo da biologia e terapia de câncer colorretal.

Já nos anos 2000, Kasper e Smith Jr. utilizaram modelos de camundongos transgênicos para o estudo do câncer de próstata. Em 2008, Chade e colaboradores, promoveram o modelo de indução tumoral ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga, após instilação intravesical de células MB49 em camundongos C57BL/6, e caracterizaram o tumor por histopatologia e imuno-histoquímica.

A busca pela cura do câncer também pode ser vista como um vasto empreendimento internacional que utiliza milhões de animais e bilhões de dólares a cada ano (DAGG, 2000). Entretanto, a utilização de animais na pesquisa do câncer desempenha um papel importante na investigação de novas modalidades de diagnóstico e tratamento. Levantamentos da literatura indicam que, entre várias espécies, os roedores têm sido amplamente utilizados na pesquisa biomédica (INGLE, 2019).

Existem quatro categorias de modelos experimentais murinos, dependendo da linhagem do animal utilizado ou da metodologia utilizada para a indução do tumor, são elas: o tipo quimicamente induzido, o modelo singênico, o modelo transgênico e o xenoenxerto (ZHANG *et al.*, 2015).

Modelos de tumor singênico são os modelos pré-clínicos mais antigos e mais amplamente utilizados para avaliar a terapia antitumoral, incluindo imunoterapia (NGIOW *et al.*, 2016; OLSON *et al.*, 2018). Utilizando linhagens de células tumorais expandidas *in vitro*, obtidas de camundongos isogênicos, como o C57BL/6, BALB/c ou FVB, é possível inocular hospedeiros imunocompetentes de tipo selvagem para estabelecer um sistema portador de tumor (JIANG e ZHOU, 1997; PÉNZVÁLTÓ *et al.*, 2019).

Normalmente, essas células tumorais são injetadas por via subcutânea, pois é mais fácil acompanhar o desenvolvimento do tumor (SCHMIDT *et al.*, 2016). Para tornar o microambiente tumoral mais próximo ao encontrado naturalmente, as células tumorais podem ser transplantadas ortotopicamente para os órgãos correspondentes. No entanto, as rotas ortotópicas requerem manipulações mais complicadas e equipamentos especiais para o transplante e monitoramento do desenvolvimento tumoral (DEVAUD *et al.*, 2013; WESTWOOD *et al.*, 2014).

4.1.3. MODELO EXPERIMENTAL COM CÉLULAS MB49

Para os modelos experimentais que utilizam animais para o estudo do câncer de bexiga, o modelo singênico apresenta as mesmas rotas de transplante, dependendo da origem celular. No modelo ortotópico, a indução tumoral ocorre na bexiga e, no modelo heterotópico, a indução tumoral é realizada em outros locais (CHAN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015).

As linhagens celulares mais utilizadas para estudos de carcinoma de bexiga, em modelos experimentais murinos, são a MB49 e MBT-2 (CHEN *et al.*, 2009). As células da linhagem MB49 foram isoladas de camundongos C57BL/6 (SUMMERHAYES e FRANKS, 1979) e as células MBT-2 foram obtidas de camundongos CH3 (SOLOWAY, 1977). Em estudos envolvendo o carcinoma urotelial de bexiga, os modelos de indução mais semelhantes ao humano, são os que utilizam a linhagem celular MB49, devido aos marcadores de superfície celular, perfil imunológico e a sensibilidade à apoptose (LOSKOG *et al.*, 2004; LOSKOG *et al.*, 2005).

Apesar da existência de diversos modelos de indução de câncer de bexiga em animais na literatura até o momento, a taxa de desenvolvimento do tumor pode variar de 30% a 100%. Deste modo, o estabelecimento de novos modelos animais confiáveis, simples e reproduzíveis continua sendo um desafio contínuo (ZHANG *et al.*, 2015). Nos estudos conduzidos previamente por nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSCar, a taxa de desenvolvimento pós-instilação intravesical varia entre 60% e 80%.

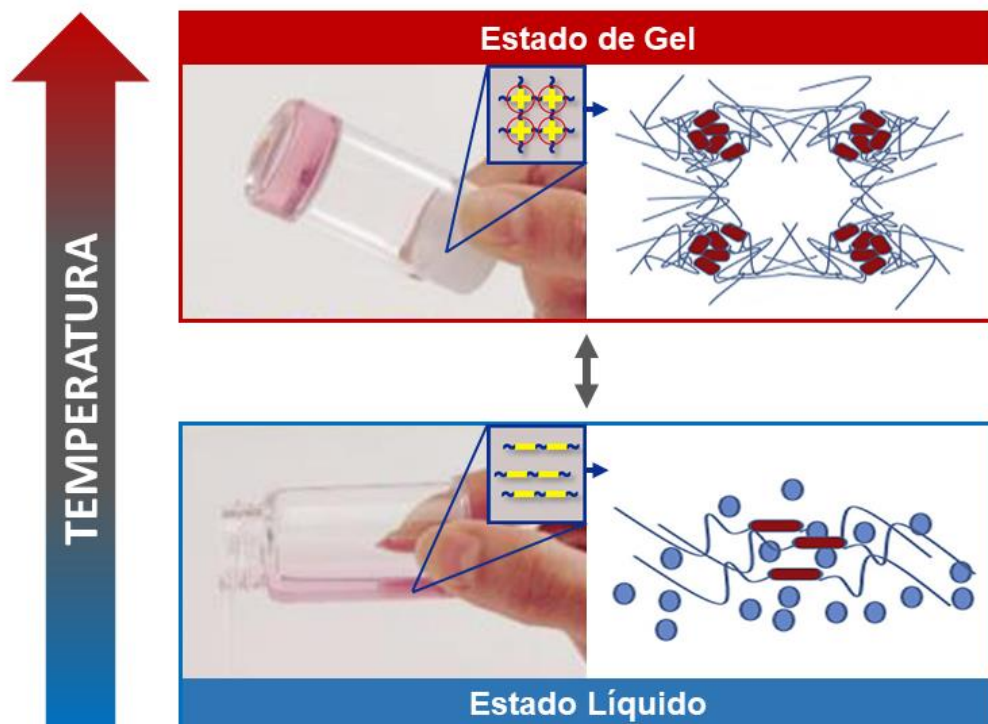
4.1.4. GÉIS POLIMÉRICOS TERMORREVERSÍVEIS

Diante da pressão das organizações protetoras de animais e mesmo da sociedade em geral, a aplicação de métodos alternativos que minimizem o número de animais utilizados por pesquisa é a base para o cumprimento das diretrizes dos '3 Rs', sendo cada vez mais incentivado, seja na indústria, seja no setor acadêmico. Deste modo, uma das alternativas para a diminuição do uso de animais, em estudos destinados ao entendimento e prevenção do câncer de bexiga, está no aumento da efetividade dos métodos de indução do tumor.

Uma alternativa para os métodos convencionais de instilação vesical das células tumorais seria a presença de um composto que aumentasse o tempo de contato dessas células com a mucosa do animal. Sistemas de liberação de uso prolongado na forma de composições semissólidas (géis, pomadas, cremes) têm sido desenvolvidos visando o maior tempo de permanência do fármaco em estudo, aumentando, portanto, sua biodisponibilidade (GABIZON *et al.*, 2012).

Géis termorreversíveis (Figura 16) para a aplicação intravesical são interessantes como sistemas de liberação por sua fácil administração, uma vez que são líquidos à temperatura ambiente e gelificam à temperatura fisiológica, favorecendo o tempo de permanência do fármaco no local de ação (DUMORTIER *et al.*, 2006). Assim, o presente estudo teve por objetivo estabelecer o modelo de câncer urotelial de bexiga, induzido por células da linhagem MB49 em camundongos C57BL/6, na presença de um gel polimérico termorreversível (TPG).

Figura 16 – Representação gráfica da transição de uma solução termorreversível do estado líquido para o estado em forma de gel, evidenciando a formação de ligações cruzadas covalentes entre as cadeias de polímero para formar uma rede macromolecular em temperaturas mais altas.



Fonte: Adaptado de PRAJAPATI e GOYAL (2013); RAROKAR *et al.*, (2018).

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um novo modelo murino ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga, induzido por células da linhagem MB49 em camundongos C57BL/6, na presença de um gel polimérico termorreversível e utilizando a indução mecânica da lesão no epitélio vesical.

4.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Comparar a taxa de desenvolvimento tumoral na presença ou não do gel polimérico termorreversível no momento da inoculação intravesical de células MB49;
- ii. Verificar possíveis efeitos adversos do TPG ao animal e correlacionar a taxa de desenvolvimento tumoral ao método de indução da lesão no epitélio vesical;
- iii. Avaliar *in vitro* a capacidade das células MB49 sobreviverem na matriz do TPG, por meio da quantificação da viabilidade, morfologia, proliferação e formação de colônias de células MB49.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Sob o registro número 9234221018 (Anexo B) na CEUA/UFSCar, 50 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com peso médio de 20g e sete semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia do DMP/UFSCar.

Toda a experimentação animal foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada do DGE/UFSCar e os protocolos experimentais foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa animal adotados pela CEUA/UFSCar, após o período de adaptação dos animais ao novo ambiente.

4.3.2. PREPARAÇÃO DO GEL POLIMÉRICO TERMORREVERSÍVEL

O sistema de liberação proposto para a comparação da taxa de desenvolvimento tumoral, no momento da inoculação intravesical de células MB49, consiste em um sistema polimérico binário composto por poloxamer 407 e quitosana (Tabela 6), conforme descrito por Gratieri (2010).

Tabela 6 – Composição do gel polimérico termorreversível.

Componentes	Concentração (% (m/m))
Poloxamer 407	15%
Quitosana	0,5%
Água destilada acidificada *	q.s.p.

* Ácido acético concentrado (0,5% em relação ao volume de água) foi utilizado na acidificação.

Fonte: O autor (2020).

4.3.3. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

Células tumorais da linhagem MB49 foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

Após a manutenção da cultura celular em estufa incubadora, a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, a confluência da monocamada celular foi observada até atingir 90%. As células aderentes foram removidas da superfície das garrafas com tripsina 2,5% (Life Technologies) e a quantificação celular direta foi realizada com azul de *Trypan* 0,4% (Life Technologies) em câmara de Neubauer.

4.3.4. CATETERIZAÇÃO TRANSURETRAL E INDUÇÃO DA LESÃO

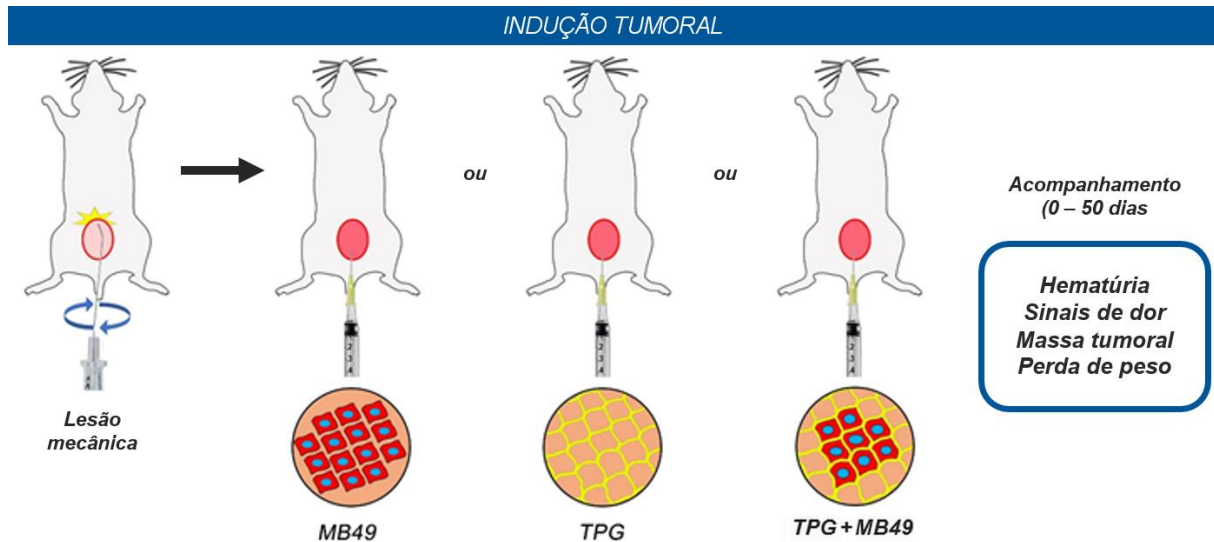
Todos os 50 animais foram previamente anestesiados, por via intraperitoneal, com 100 µL de uma solução contendo cloridrato de cetamina (90 mg/kg, Dopalen[®], Ceva) e xilazina (10 mg/kg, Anasedan[®], Ceva), e um algodão embebido com soro fisiológico foi colocado em contato com os olhos dos animais.

Sob efeito dos anestésicos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à cateterização transuretral com cateter intravenoso de polietileno de 24 G (0,7x19 mm), sem agulha, e ampla lubrificação com vaselina. Após o esvaziamento da bexiga, a lesão mecânica do epitélio vesical foi induzida em todos os animais, com o auxílio de uma agulha com a ponta curvada (5 a 7 graus), inserida no cateter e rotacionada por 5 vezes, como descrito por Yang e colaboradores (2012).

4.3.5. INOCULAÇÃO INTRAVESICAL DE CÉLULAS TUMORAIS

Para a comparação da taxa de desenvolvimento tumoral, os camundongos obtidos foram divididos em três grupos (Figura 17): Grupo B1 (n = 20 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo 50 µL de suspensão celular a 5×10^5 células MB49 por camundongo e 50 µL de gel polimérico termorreversível (concentração de 50%); Grupo B2 (n = 20 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo apenas suspensão celular a 5×10^5 células MB49 por camundongo, sem a presença de nenhum sistema de liberação; Grupo B3 (n = 10 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo 50 µL de meio DMEM e 50 µL de gel polimérico termorreversível (concentração de 50%), sem indução tumoral, a fim de observar possíveis efeitos colaterais promovidos pelo TPG aos animais.

Figura 17 – Fluxograma da metodologia de experimentação para o possível desenvolvimento de uma nova metodologia de indução tumoral. Os camundongos foram submetidos à indução mecânica da lesão e divididos em três grupos: Grupo B1 (TPG+MB49, n = 20); Grupo B2 (Somente MB49, n = 20); e Grupo B3 (Somente TPG, n = 10). A fim de determinar a sobrevida cumulativa, os animais foram acompanhados por até 50 dias, sendo eutanasiado assim que apresentou hematuria em conjunto com qualquer outro sinal correspondente ao desenvolvimento tumoral.



Fonte: O autor (2020).

Após o procedimento de inoculação intravesical, os animais foram mantidos em decúbito dorsal, para que o conteúdo inoculado permanecesse no interior da bexiga, e, cerca de 45 minutos após o início do procedimento de anestesia, os cateteres foram removidos.

4.3.6. ACOMPANHAMENTO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

A fim de determinar a sobrevida cumulativa, os animais foram mantidos em observação por até 50 dias, em que os sintomas correspondentes ao desenvolvimento tumoral, como hematuria, dor, presença de massa palpável na região pélvica ou diminuição do peso do animal, foram observados diariamente.

Assim que o animal apresentou hematuria em conjunto com qualquer outro sinal correspondente ao desenvolvimento tumoral, o mesmo foi eutanasiado por sobredosagem intraperitoneal da associação de cloridrato de cetamina (270 mg/kg, Dopalen[®], Ceva) com xilazina (30 mg/kg, Anasedan[®], Ceva). Os cadáveres dos animais foram mantidos em freezer -80°C, até o recolhimento pelo serviço de coleta de resíduos de serviços de saúde.

4.3.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM RESAZURINA

Células tumorais da linhagem MB49 foram cultivadas em microplacas de 96 poços (1×10^5 células/poço) em quadruplicata, utilizando meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A microplaca foi incubada *overnight* em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%. Após esse período, o sobrenadante foi removido e as células expostas, por 24 horas, à uma solução contendo meio DMEM e TPG em diferentes concentrações (6,25, 12,5, 25 e 50%).

Após as 24 horas, os sobrenadantes foram descartados e o ensaio de viabilidade celular realizado através da adição de 180 µL de uma solução com meio DMEM (Cultilab) e 70 µM de resazurina (Sigma-Aldrich), em cada poço. A microplaca foi novamente incubada em estufa incubadora e ao abrigo da luz, por 3 horas, a fim de permitir que as células viáveis metabolizassem e reduzissem a resazurina em resorufina (O'BRIEN *et al.*, 2000).

Assim que a solução passou de uma coloração azul para rosa, 150 µL do meio de cada poço foram transferidos para uma outra microplaca de 96 poços. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 570 nm e 600 nm como referência, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340®, Biochrom).

Também foi realizado um outro experimento de viabilidade, em que células MB49 foram cultivadas em microplacas de 6 poços, até atingirem 90% de confluência, e expostas ao TPG por 24 horas, nas concentrações de 25 e 50%. Porém, após a exposição, as células aderentes foram removidas da superfície dos poços por tripsinização e novamente cultivadas, em microplacas de 96 poços, por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram descartados e o ensaio de viabilidade celular por resazurina realizado.

4.3.8. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

A influência do TPG na capacidade de proliferação e formação de colônias das células tumorais foi investigada através do ensaio de formação de colônias. Células tumorais da linhagem MB49 foram cultivadas em microplacas de 6 poços, utilizando meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab),

suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A microplaca foi incubada por 48 horas, período em que monocamada celular atingiu 90% de confluência, em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%. Após esse período, o sobrenadante foi removido e as células expostas, por 24 horas, à uma solução contendo meio DMEM e TPG nas concentrações de 25 e 50%. No dia seguinte, as células aderentes foram removidas da superfície dos poços com tripsina 2,5% (Life Technologies) e a quantificação celular direta do grupo controle (sem exposição ao TPG) foi realizada com azul de *Trypan* 0,4% (Life Technologies) em câmara de Neubauer.

Após a quantificação celular do grupo controle, foi pipetado o volume necessário para o cultivo de 1×10^3 células MB49 viáveis por poço (em quintuplicata), em microplacas de 48 poços, utilizando meio DMEM (Cultilab). Para os grupos expostos ao TPG, foi utilizado o mesmo volume utilizado no plaqueamento do grupo controle. As microplacas foram mantidas em estufa incubadora, por 48 horas, até a observação das unidades formadoras de colônia.

4.3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das curvas de sobrevida dos grupos MB49 e TPG+MB49 foram feitas pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* por meio do software Prism®, versão 5.0 (GraphPad Software). O número de animais (n) utilizado neste Capítulo foi calculado com base na distribuição binomial e considerando uma eficiência de 70% no desenvolvimento de tumores no grupo controle, sem tratamento.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. ANÁLISE DA SOBREVIDA CUMULATIVA DOS ANIMAIS

Apesar da existência de diversos modelos de indução de câncer de bexiga em animais na literatura até o momento, a taxa de desenvolvimento do tumor pode variar de 30% a 100%. Assim, o estabelecimento de novos modelos animais confiáveis, simples e reproduzíveis continua sendo um desafio contínuo nesta área (ZHANG *et al.*, 2015). Uma alternativa para a diminuição do uso de animais, em estudos destinados ao entendimento e prevenção do câncer de bexiga, seria o aumento da efetividade dos métodos de indução do tumor.

Visando o estabelecimento de uma metodologia mais efetiva para a indução do modelo *in vivo* de câncer urotelial de bexiga em camundongos, a primeira modificação na metodologia convencional foi a utilização de uma nova técnica para a indução da lesão do epitélio vesical, visto que a utilização do nitrato de prata para a indução química da lesão, conforme descrita por Luo e colaboradores (2004) acaba sendo tóxica às células inoculadas posteriormente e produz lesões tumorais que se implantam em diversas partes da bexiga.

Uma outra alternativa para os métodos convencionais de instilação vesical das células tumorais seria a presença de um composto que aumentasse o tempo de contato dessas células com a mucosa do animal. Deste modo, um gel polimérico termorreversível, composto por poloxamer 407 e quitosana, foi utilizado no momento da inoculação das células tumorais.

A escolha dos polímeros poloxamer 407 e quitosana para a formulação do TPG é fundamentada por suas propriedades físico-químicas. O poloxamer 407 é um polímero sintético não iônico e termorreversível, considerado atóxico e inerte ao tecido de mucosa. Possui propriedade anfipática e é composto por blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) e hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (TALASAZ *et al.*, 2008). A quitosana, por sua vez, é um polímero biodegradável, com propriedades mucoadesivas bem estabelecidas na literatura (LEHR *et al.*, 1992; MAKHLOF *et al.*, 2008). A adição da quitosana ao TPG, contribui para aumentar a força mecânica da formulação (HASSAN *et al.*, 1990).

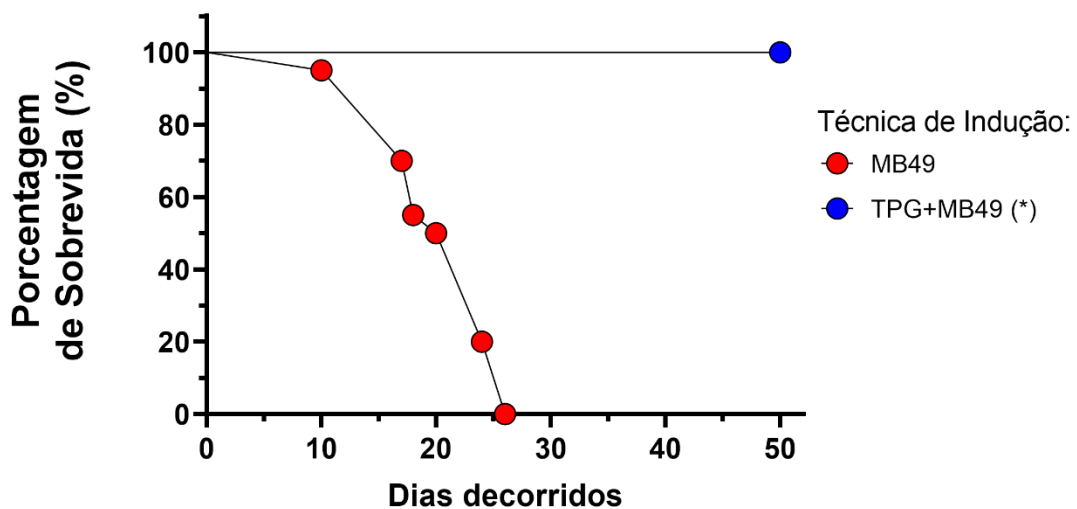
Após a indução da lesão mecânica do epitélio vesical, seguida pela inoculação do gel polimérico termorreversível, em conjunto ou não às células tumorais, a

sobrevida cumulativa de todos os animais foi analisada, por meio do acompanhamento durante 50 dias.

A presença de hematúria é o principal indicativo do desenvolvimento tumoral, desta maneira, sua presença em conjunto com qualquer outro sintoma, como dor, massa tumoral palpável ou diminuição do peso abaixo de 15 g, foi determinante para a promoção da eutanásia de cada animal.

Após 26 dias de acompanhamento, todos os animais do Grupo B2, inoculados apenas com células MB49, já haviam sido eutanasiados ou morreram em decorrência da doença. Porém, neste mesmo período de acompanhamento, nenhum animal do Grupo B1, inoculado com células MB49 e TPG, morreu em decorrência da indução do modelo tumoral ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga (Figura 18).

Figura 18 – Sobrevida cumulativa dos animais nos grupos experimentais após a instilação de células MB49, na presença (Grupo B1, n = 20) ou não (Grupo B2, n = 20) do TPG. Os animais foram acompanhados durante 50 dias, em que o aparecimento de sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral foi observado. Significante de sobrevivência foi obtida após 26 dias, após a morte ou eutanásia de todos os animais do grupo exposto ao TPG, pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em comparação com o grupo controle.



Fonte: O autor (2020).

Assim, a análise da curva de sobrevida cumulativa demonstrou que o modelo de desenvolvimento tumoral utilizando o sistema de liberação, composto por quitosana e poloxamer 407, no momento da instilação vesical das células MB49, promoveu uma taxa de sobrevivência de 100% dos animais. A ausência de

desenvolvimento tumoral, pós-instilação intravesical, pode indicar um efeito imunogênico do TPG dentro do ambiente vesical.

Estes resultados podem ser explicados pelas propriedades imunoestimulantes da quitosana, que pode agir como um importante adjuvante para imunoterapia. Essa atividade imunoestimulante, juntamente com as semelhanças estruturais entre os derivados da quitina e os glucanos, tem levado muitos pesquisadores a investigar as propriedades adjuvantes da quitosana (BUETER *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2017).

A utilização da técnica de indução mecânica da lesão no epitélio vesical se mostrou superior à utilização da indução química, ao promover uma taxa de desenvolvimento tumoral cerca de 25% maior quando comparadas às taxas anteriores de sucesso pós-instilação obtidas por nosso grupo de pesquisa. A administração do gel polimérico termorreversível não promoveu nenhum efeito adverso aos animais.

4.4.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO TPG

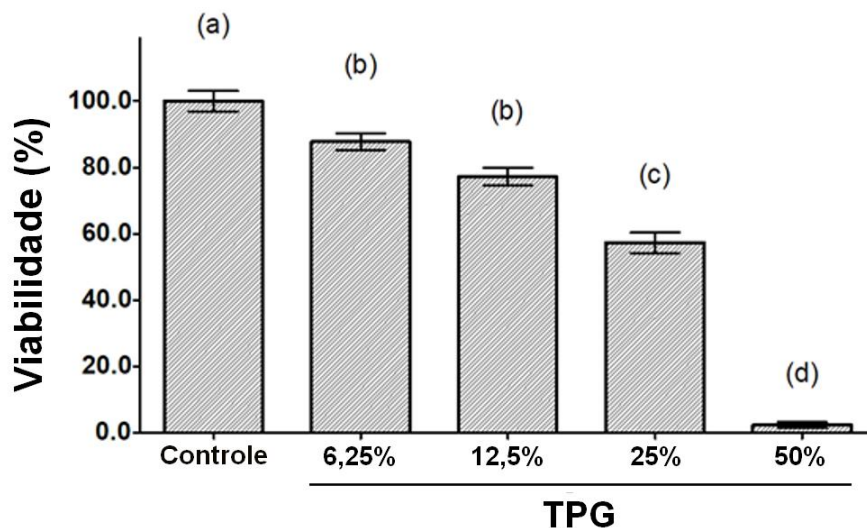
A fim de investigar a influência do gel polimérico termorreversível na viabilidade de células tumorais da linhagem MB49, foi realizado um ensaio de resazurina, em que a viabilidade celular foi avaliada após exposição ao TPG, nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50%, por 24 horas (Figura 19).

Os resultados obtidos mostram uma redução significativa na viabilidade das células MB49 pós-exposição ao TPG, nas concentrações de 50% e 25%, após a comparação com o grupo controle (sem a presença de TPG). Estes resultados surpreenderam, já que o TPG utilizado é considerado um sistema de liberação inerte e atóxico (TALASAZ *et al.*, 2008). No entanto, esse resultado corrobora outros trabalhos que mostraram efeitos citotóxicos da quitosana sobre células tumorais (KUPPUSAMY e KARUPPAIAH, 2012; GIBOT *et al.*, 2018).

O estudo de Salehi e colaboradores (2017) demonstrou o efeito antiproliferativo da quitosana em células das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e T47D, promovendo a apoptose nessas células de câncer de mama, além de demonstrar a falta de toxicidade para células normais de fibroblastos (L929). O efeito inibidor de crescimento pós-tratamento com quitosana também foi observado em células tumorais da linhagem 5637 de câncer de bexiga humano, demonstrado por análise de fragmentação do DNA, em que houve a indução de apoptose via ativação da caspase-3 (HASEGAWA

et al., 2001). Deste modo, ao comparar nossos resultados com os encontrados na literatura, podemos sugerir que a quitosana, além de ser descrita como um polímero seguro para células normais, promove a morte celular programada em células tumorais.

Figura 19 – Avaliação da viabilidade das células MB49 após exposição ao TPG por 24 horas. O gráfico de barras mostra o resultado do ensaio de viabilidade das células MB49 após a exposição a diferentes concentrações do TPG (6,25, 12,5, 25 e 50%). Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle. As células foram cultivadas em quadruplicata e a viabilidade foi analisada com resazurina (70 μ M). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de Tukey para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na viabilidade.



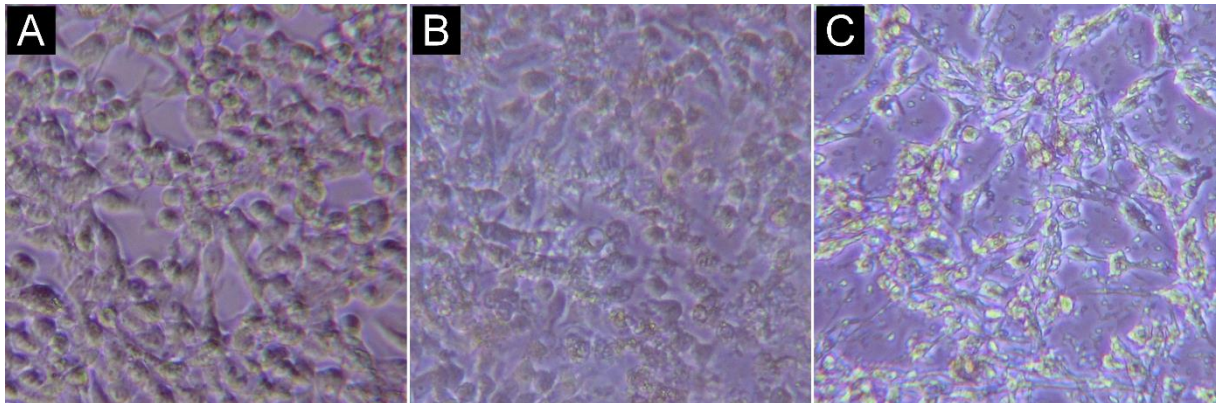
Fonte: O autor (2020).

Apesar da diminuição da viabilidade nos grupos expostos ao gel polimérico termorreversível, foi possível observar que as células MB49 permaneceram aderidas nos poços da microplaca de cultura, após a exposição por 24 horas, até mesmo no grupo exposto ao TPG a 50% (Figura 20).

O fato das células MB49, expostas ao TPG a 50%, continuarem aderidas após o ensaio de viabilidade mostrar a presença de apenas 2% de células viáveis para este grupo, pode ser explicado pela formação de uma matriz tridimensional promovida pela aplicação do TPG. Essa matriz engloba as células e evita que as mesmas se soltem, mesmo após mortas, corroborando com diversos estudos de engenharia de tecidos, que propõem a criação de matrizes tridimensionais a partir de géis poliméricos

(CAICEDO-CARVAJAL *et al.*, 2012; NASCIMENTO e LOMBELLO *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2017).

Figura 20 – Matriz tridimensional promovida pelo tratamento com gel polimérico termorreversível em células MB49. As imagens obtidas por microscopia óptica, após a exposição das células MB49 ao TPG a (A) 0%, (B) 25% e (C) 50%, mostram que apesar da viabilidade celular ter diminuído significativamente nos grupos expostos, em especial no grupo exposto ao TPG a 50%, as células permaneceram aderidas no fundo do poço da microplaca.



Fonte: O autor (2020).

Para confirmar se as células expostas às altas concentrações TPG realmente não estavam viáveis, um novo ensaio de viabilidade por resazurina foi realizado, desta vez com o recolhimento das células aderentes por tripsinização, após a exposição ao TPG a 25 e 50%. As células recolhidas foram novamente cultivadas por 24 horas e, após esse período, os sobrenadantes foram descartados e o ensaio de viabilidade celular por resazurina realizado (Figura 21).

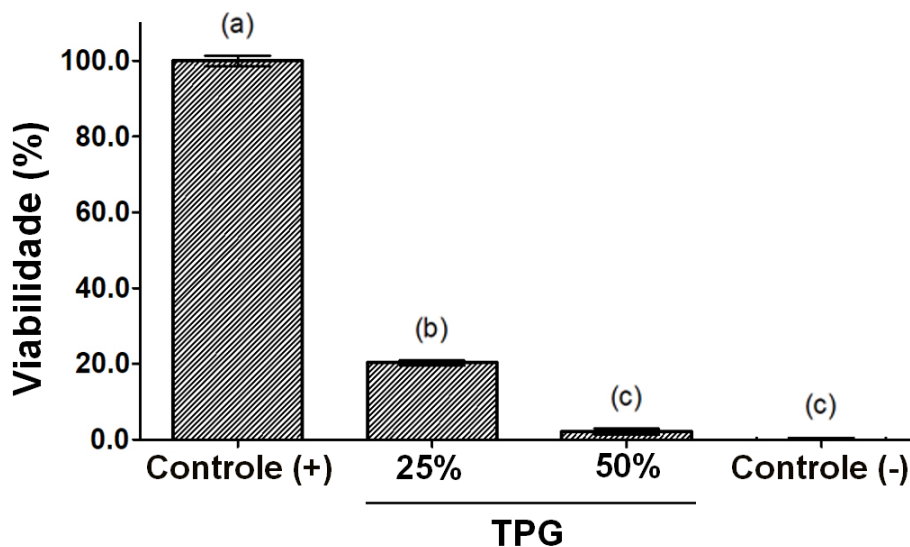
Os resultados novamente mostraram uma redução significativa da viabilidade das células, após exposição ao TPG. No grupo exposto ao TPG a 50%, a taxa de viabilidade foi de aproximadamente 2%, mantendo a mesma taxa encontrada no experimento anterior.

Para o grupo exposto ao TPG a 25%, a taxa de viabilidade foi inferior à encontrada no experimento anterior. Este resultado pode ser explicado pela submissão das células à adversa metodologia de plaqueamento, que inclui a exposição à tripsina e centrifugação, bem como ao pouco tempo para o restabelecimento da cultura celular.

Este novo ensaio de viabilidade celular confirmou que as células não estavam metabolizando a resazurina por realmente já estarem mortas, visto que no momento

em que a resazurina foi adicionada ao poço, as células já estavam livres da matriz tridimensional, devido à centrifugação seguida de novo plaqueamento.

Figura 21 – Avaliação da viabilidade das células MB49 após exposição ao TPG por 24 horas e novo plaqueamento pós-exposição. O gráfico de barras mostra o resultado do ensaio de viabilidade das células MB49 após a exposição a diferentes concentrações do TPG (6,25, 12,5, 25 e 50%). Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle de células viáveis. As células foram cultivadas em quadruplicata e a viabilidade celular foi analisada com resazurina (70 μ M). Os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de Tukey para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na viabilidade.



Fonte: O autor (2020).

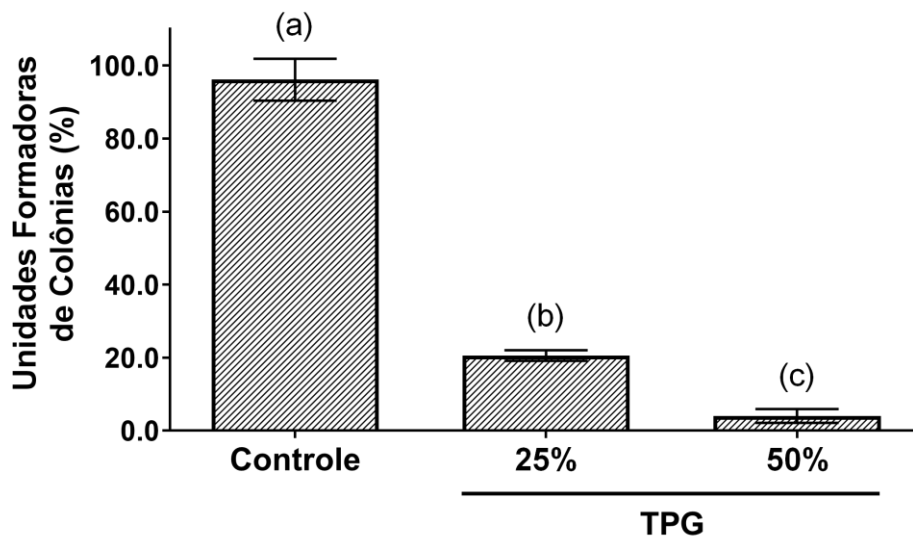
4.4.3. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

A fim de avaliar a capacidade residual de proliferação e formação de colônias das células tumorais da linhagem MB49, após a exposição ao TPG a 25 ou 50%, por 24 horas, foi realizado um ensaio de formação de colônias. Para este ensaio, as células foram recolhidas, novamente plaqueadas (1×10^3 células por poço), por 48 horas, e as unidades formadoras colônia foram contadas em microscópio óptico (Figura 22).

Após a exposição por 24 horas, observou-se que no grupo exposto à menor concentração de TPG investigada (25%), 20% das células mantiveram a capacidade de proliferação. Quando expostas à uma maior concentração de TPG (50%), somente 4% das células recuperadas conseguiram proliferar e formar colônias. Este resultado do teste de proliferação corrobora com os encontrados anteriormente nos ensaios com

resazurina (Figuras 19 e 21), em que a viabilidade celular também foi reduzida após a exposição ao TPG, principalmente na concentração de 50%.

Figura 22 – Avaliação da formação de colônias de células MB49 após exposição ao TPG, por 24 horas. O gráfico de barras mostra o resultado da capacidade de proliferação e formação de colônias de células da linhagem MB49, analisada após a exposição ao TPG, nas concentrações de 25 e 50%, seguido de novo plaqueamento com meio DMEM por 48 horas. Células cultivadas sem a presença do TPG foram consideradas controle. As células foram cultivadas em quintuplicata e os dados estão expressos como média \pm EPM e valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos após análise com teste ANOVA de fator único e teste de Tukey para comparações *post-hoc* entre os grupos. As barras com letras distintas apresentam diferenças significativas na capacidade de formação de colônias.



Fonte: O autor (2020).

4.5. CONCLUSÕES

A utilização da técnica de indução mecânica da lesão no epitélio vesical se mostrou superior à utilização da técnica de indução química da lesão. A administração do TPG não demonstrou nenhum efeito adverso aos animais e, surpreendentemente, promoveu uma taxa de sobrevivência de 100% nos animais expostos. A viabilidade e a capacidade de formação de colônias das células tumorais da linhagem MB49 foi reduzida pela matriz de TPG.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. **Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico**. *Ciência Hoje*, v. 39, n. 231, p. 24-29, 2006.

BUETER, C. L.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. **Innate sensing of chitin and chitosan**. *PLOS Pathogens*, v. 9, n. 1, p. e1003080, 2013.

CHADE, D. C.; ANDRADE, P. M.; BORRA, R. C. *et al.* **Histopathological characterization of a syngeneic orthotopic murine bladder cancer model**. *International Brazilian Journal of Urology*, v. 34, n. 2, p. 220-229, 2008.

CHAN, E.; PATEL, A.; HESTON, W. *et al.* **Mouse orthotopic models for bladder cancer research**. *BJU international*, v. 104, n. 9, p. 1286-1291, 2009.

CHEN, F.; ZHANG, G.; CAO, Y. *et al.* **MB49 murine urothelial carcinoma: Molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin**. *The Journal of Urology*, v.182, n.6, p.2932-2937, 2009.

CHEN, P.; HUANG, Z.; SUN, Z. *et al.* **Chitosan nanoparticles based nanovaccines for cancer immunotherapy**. *Pure and Applied Chemistry*, v. 89, n. 7, p. 931-939, 2017.

DAGG, A. I. **Animal experimentation in cancer research: A citation analysis**. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, v. 3, n. 3, p. 239-251, 2000.

DEVAUD, C.; WESTWOOD, J. A.; JOHN, L. B. *et al.* **Tissues in different anatomical sites can sculpt and vary the tumor microenvironment to affect responses to therapy**. *Molecular Therapy*, v. 22, n. 1, p. 18-27, 2013.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. *et al.* **A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics**. *Pharmaceutical research*, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T. **Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 4, p. 388-398, 2012.

GARRAFA, V. **Os limites da ética e da moral na pesquisa científica.** Humanidade – Biologia. Brasília: UnB, v. 48, p. 209-213, 2001.

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo*.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. **A simple rheological method for the *in vitro* assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength.** Pharmaceutical Research, v. 7, n. 5, p. 491-495, 1990.

INGLE, A. D. alternatives and refinement for animal experimentation in cancer research. *In*: KOJIMA H.; SEIDLE, T.; SPIELMANN, H. Editores. **Alternatives to animal testing.** Singapore: Springer, 2019. 130p.

JIANG, F.; ZHOU, X. M. **A model of orthotopic murine bladder (MBT-2) tumor implants.** Urological Research, v. 25, n. 3, p. 179-182, 1997.

KASPER, S.; SMITH Jr., J. A. **Genetically modified mice and their use in developing therapeutic strategies for prostate cancer.** The Journal of Urology, v.172, n. 1, p.12-19, 2004.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H. *et al.* ***In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers.** International Journal of Pharmaceutics, v. 78, n. 1-3, p. 43-48, 1992.

LI, X.; MIN, M.; DU, N. *et al.* **Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine.** Clinical and Developmental Immunology, v. 2013, p. 387023, 2013.

LOSKOG, A.; DZOJIC, H.; VIKMAN, S. *et al.* **AdCD40L gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor microenvironment.** Journal of Immunology, v. 172, n. 11, p. 7200-7205, 2004.

LOSKOG, A.; NINALGA, C.; HEDLUND, T. *et al.* **Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy.** Laboratory animals, v. 39, n. 4, p. 384-393, 2005.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. **Use of prostate specific antigen to measure bladder tumor growth in a mouse orthotopic model.** The Journal of Urology, v. 172, n. 6, p. 2414-2420, 2004.

MAKHLOF, A.; WERLE, M.; TAKEUCHI, H. **Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 18, n. 6, p. 375-386, 2008.

NGIOW, S. F.; LOI, S.; THOMAS, D. M. *et al.* **Mouse models of tumor immunotherapy.** Advances in Immunology, v. 130, p. 1-24, 2016.

OLSON, B.; LI, Y.; LIN, Y. *et al.* **Mouse models for cancer immunotherapy research.** Cancer Discovery, v. 8, n. 11, p. 1358-1365, 2018.

PÉNZVÁLTÓ, Z., CHEN, J. Q.; TEPPER, C. G. *et al.* **A syngeneic ErbB2 mammary cancer model for preclinical immunotherapy trials.** Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 24, n. 2, p. 149-162, 2019.

PRAJAPATI, N. B.; GOYAL, A. **Thermoreversible mucoadhesive *in situ* gel: A review.** International Journal of Innovative Drug Discovery, v. 3, n. 2, p. 67-84, 2013.

RAROKAR, N. R.; SAOJI, S. D.; KHEDEKAR, P. B. **Investigation of effectiveness of some extensively used polymers on thermoreversible properties of Pluronic® tri-block copolymers.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 44, p. 220-230, 2018.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique – Special edition.** London: UFAW, 1992. 238p.

SCHACKERT, H. K.; FIDLER, I. J. **Development of an animal model to study the biology of recurrent colorectal cancer originating from mesenteric lymph system metastases.** International Journal of Cancer, v. 44, n. 1, p.177-181, 1989.

SCHMIDT, K. M.; GEISLER, E. K.; LANG, S. A. **Subcutaneous murine xenograft models: A critical tool for studying human tumor growth and angiogenesis *in vivo*.** Methods in Molecular Biology, v. 1464, p. 129-137, 2016.

SOLOWAY, M. S. **Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer.** Cancer Research, v. 37, n. 8, p. 2918-2929, 1977.

STEPHENS, M. L.; GOLDBERG, A. M.; ROWAN, A. N. The first forty years of the Alternatives Approach: Refining, reducing, and replacing the use of laboratory animals. *In*: SALEM, D. J.; ROWAN, A. N. Editores. **The state of the animals: 2001.** Washington: Humane Society Press, 2001. p. 121-135.

SUMMERHAYES, I. C.; FRANKS, L. M. **Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium *in vitro*.** Journal of the National Cancer Institute, v. 62, n. 4, p. 1017-1023, 1979.

TALASAZ, A. H. H.; GHAREMANKHANI, A. A.; MOGHADAM, S. H. *et al.* ***In situ* gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl cellulose or hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for controlled delivery of vancomycin.** Journal of Applied Polymer Science, v. 109, n. 4, p. 2369-2374, 2008.

WESTWOOD, J. A.; DARCY, P. K.; KERSHAW, M. H. **The potential impact of mouse model selection in preclinical evaluation of cancer immunotherapy.** OncoImmunology, v. 3, n. 7, p. e946361, 2014.

YANG, X. H.; REN, L. S.; WANG, G. P. *et al.* **A new method of establishing orthotopic bladder transplantable tumor in mice.** Cancer Biology & Medicine, v. 9, n. 4, p. 261-265, 2012.

ZHANG, N.; LI, D.; SHAO, J. *et al.* **Animal models for bladder cancer: The model establishment and evaluation (review).** Oncology Letters, v. 9, n. 4, p. 1515-1519, 2015.

CAPÍTULO 3

IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL COM CÉLULAS MB49 EMBEBIDAS EM MATRIZ DE GEL TERMORREVERSÍVEL ESTIMULA RESPOSTA IMUNOLÓGICA ANTITUMORAL E BLOQUEIA O DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA EM MODELO MURINO C57BL/6 ORTOTÓPICO E SINGÊNICO

RESUMO

IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL COM CÉLULAS MB49 EMBEBIDAS EM MATRIZ DE GEL TERMORREVERSÍVEL ESTIMULA RESPOSTA IMUNOLÓGICA ANTITUMORAL E BLOQUEIA O DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA EM MODELO MURINO C57BL/6 ORTOTÓPICO E SINGÊNICO

Pesquisando técnicas de indução de câncer de bexiga em modelo murino, nos deparamos com uma possível ação antitumoral de um gel polimérico termorreversível preparado com quitosana (TPG) às células MB49. A baixa imunogenicidade de vacinas antitumorais continua a ser um fator limitante no combate às neoplasias malignas. O aumento da imunogenicidade de antígenos fracos usando polímeros biodegradáveis, como a quitosana, tem sido observado na área da imunoterapia contra o câncer. Entretanto, os efeitos da utilização vacinal da combinação de células tumorais e quitosana, em modelos de câncer de bexiga, principalmente usando a via intravesical para a estimulação da resposta imune antitumoral, são desconhecidos. Deste modo, propomos avaliar a eficácia de uma matriz de gel polimérico termorreversível, formada por quitosana e poloxamer 407, associada com células MB49, como vacina intravesical antitumoral, usando o modelo murino C57BL/6 singênico e ortotópico de carcinoma urotelial de bexiga. Para isso, a eficácia do TPG foi analisada, formando três grupos de animais: Grupo controle, TPG e TPG+MB49 onde, na fase de vacinação, o grupo TPG+MB49 foi submetido a uma lesão traumática na parede da bexiga, com imediata instilação intravesical do composto vacinal contendo células MB49 embebidas em TPG. O grupo TPG foi submetido aos mesmos procedimentos, utilizando o composto contendo o gel diluído em meio, e o grupo controle utilizando somente o meio de cultura. Após 21 dias, os animais foram desafiados com a indução tumoral. Os ensaios *in vitro* mostraram perda de viabilidade e incapacidade de proliferação, após exposição ao TPG. Os testes *in vivo* mostraram que os animais previamente imunizado com TPG+MB49 apresentaram maior sobrevida cumulativa, bem como peso e tamanho vesical significativamente menor, em contraste com os outros dois grupos que não apresentaram evolução tumoral estatisticamente diferente. Além disso, os esplenócitos desses animais também apresentaram taxa de citotoxicidade antitumoral maior e com maior liberação de LDH no meio, em relação aos grupos TPG e controle. Assim, podemos concluir que células MB49 embebidas em matriz de gel polimérico termorreversível com quitosana, usadas na forma de vacina intravesical, são capazes de estimular resposta imune sistêmica e afetar o desenvolvimento do tumor de bexiga em modelo murino C57BL/6 ortotópico singênico.

Palavras chaves: Câncer de Bexiga; Imunização; Imunogenicidade; Quitosana.

ABSTRACT

VACCINE WITH MB49 CELLS EMBEDDED IN THERMORREVERSIBLE GEL MATRIX STIMULATES AN ANTITUMORAL IMMUNOLOGICAL RESPONSE AND BLOCKS THE DEVELOPMENT OF UROTELIAL BLADDER CARCINOMA IN C57BL/6 ORTOTOPIC MURINE MODEL

Researching techniques for bladder cancer induction in a murine model, we came across a possible antitumor action of a polymeric thermoreversible gel prepared with chitosan (TPG) to MB49 cells. The low immunogenicity of anti-tumor vaccines remains a limiting factor in the fight against malignant neoplasms. The increase in the immunogenicity of weak antigens using biodegradable polymers, such as chitosan, has been observed in the cancer immunotherapy field. However, the effects of the vaccine using a combination of tumor cells and chitosan in models of bladder cancer, mainly using the intravesical route to stimulate the antitumor immune response, are unknown. In this way, we propose to evaluate the efficacy of a thermoreversible polymeric gel matrix, formed by chitosan and poloxamer 407, associated with MB49 cells, as intravesical antitumor vaccine, using the murine and orthotopic C57BL/6 model of bladder urothelial carcinoma. For this purpose, the effectiveness of TPG was analyzed, with the formation of three experimental groups: Control group, TPG and TPG + MB49. In the vaccination phase, the TPG + MB49 group underwent a traumatic injury to the bladder wall, with immediate intravesical instillation of the vaccine compound containing MB49 cells embedded in TPG. The TPG group was subjected to the same procedures, using the compound containing the gel diluted in medium, and the control group using only the culture medium. After 21 days, the animals were challenged with tumor induction. *In vitro* tests showed loss of viability and inability to proliferate after exposure to TPG. *In vivo* tests showed that animals previously immunized with TPG+MB49 had higher cumulative survival, as well as significantly lower bladder weight and size, in contrast to the other two groups that did not show a statistically different tumor evolution. In addition, the splenocytes of these animals also showed a higher rate of antitumor cytotoxicity and a greater release of LDH in the medium, in relation to the TPG and control groups. Thus, we can conclude that MB49 cells embedded in a polymeric thermoreversible gel matrix with chitosan, used in the form of an intravesical vaccine, are able to stimulate a systemic immune response and affect the development of the bladder tumor in orthotopic and syngenic C57BL/6 murine model.

Keywords: Bladder Cancer; Immunization; Immunogenicity; Chitosan.

5.1. INTRODUÇÃO

5.1.1. SISTEMA IMUNE E IMUNOGENICIDADE TUMORAL

É conhecido há muito tempo que o sistema imunológico exerce um papel duplo no desenvolvimento de neoplasias, com uma função antitumoral e outra pró-tumoral. Embora as células imunes tenham a capacidade de reconhecer antígenos tumorais e atacar tumores, fatores pró-angiogênicos, citocinas e fatores de crescimento podem promover a progressão tumoral. (GONZALEZ *et al.*, 2018; ZHANG e ZHANG, 2020).

Em 1909, Ehrlich propôs que o sistema imunológico protege o hospedeiro de grande parte das potenciais ocorrências de neoplasias (EHRlich, 1909). A partir da década de 1950, a hipótese da imunovigilância do câncer foi formulada por Burnet, sugerindo que os linfócitos reconhecem antígenos de células transformadas e eliminam tumores antes que se tornem clinicamente evidentes (BURNET, 1957; BURNET, 1970).

Entretanto, o sistema imunológico não consegue erradicar todas as neoplasias e, devido à interação com as células tumorais no momento de seu desenvolvimento, leva a uma pressão seletiva darwiniana de tumores com baixa imunogenicidade, selecionando os clones emergentes com mecanismos de escape ao reconhecimento imunológico e erradicação (DUNN *et al.*, 2002; GREAVES e MALEY, 2012).

Desta maneira, o conceito de imunovigilância do câncer tem sido considerado parte de uma hipótese refinada e mais ampla de imunoedição do câncer. A imunoedição é definida como um processo com três fases distintas, conhecido também como “os três *Es* da imunoedição”: eliminação, equilíbrio e evasão (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004; SCHREIBER *et al.*, 2011).

A primeira fase da imunoedição envolve o reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imune, promovendo a eliminação de grande parte destas células. A seguir, as células de baixa imunogenicidade não destruídas, que carregam mutações que possibilitaram sua resistência, coexistem com as células e moléculas do sistema imune. A última fase deste processo consiste na expansão destas células neoplásicas, selecionadas pelo sistema imune, agora em um ambiente teoricamente inerte (KHONG e RESTIFO, 2002; KOEBEL *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de estratégias que possam ter como alvo esses mecanismos de escape tumoral tem sido o ponto central de diversos estudos

atualmente. Intervenções que visam a indução de nova resposta imune ou mesmo a potencialização de respostas imunológicas já existentes contra células tumorais são denominadas como imunoterapias. Conhecendo a complexidade da interação entre imunologia e câncer, a maioria das imunoterapias combinam diferentes estratégias e mecanismos de ação contra o câncer (ZHANG e ZHANG, 2020).

5.1.2. IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER

A primeira tentativa de estimular a resposta imune com a finalidade do tratamento do câncer foi realizada há mais de um século, quando, em 1891, Coley utilizou uma mistura de toxinas bacterianas para tratar um tipo de sarcoma (COLEY, 1891; COLEY, 1910). Na década de 1920, a administração de BCG, uma vacina contra a tuberculose, também mostrou eficácia no tratamento do câncer de bexiga (CALMETTE *et al.*, 1927).

Atualmente, diversos medicamentos imunoterápicos já foram testados e aprovados para o tratamento do câncer (KIRKWOOD *et al.*, 2012; SHORE, 2015). As imunoterapias normalmente são classificadas como passivas ou ativas, de acordo com sua capacidade em ativar o sistema imunológico hospedeiro contra as células malignas. As imunoterapias passivas incluem soroterapia, em que anticorpos monoclonais contra antígenos tumorais são administrados para ajudar no reconhecimento imunológico de células tumorais, e terapia celular adotiva, em que linfócitos T tumor-específicos são expandidas *ex vivo* e então reinjetados no paciente (GALLUZZI *et al.*, 2014).

A soroterapia utiliza a administração de anticorpos monoclonais para ativar uma resposta imune mediada por células dependente de anticorpos ou para entregar, de maneira específica, compostos tóxicos às células tumorais. Embora essas terapias tenham mostrado resultados promissores com especificidade de entrega, baixa toxicidade e boas respostas clínicas, há um risco de os tumores regularem negativamente o antígeno tumoral-alvo e, assim, desenvolver resistência à terapia. RESLAN *et al.*, 2009).

Anticorpos monoclonais imunoestimuladores que se ligam e ativam receptores, como a molécula CD28 co-estimulatória de Linfócitos T, bem como anticorpos monoclonais que bloqueiam receptores inibitórios, como o receptor da proteína CTLA-4 em linfócitos T citotóxicos, já foram testados clinicamente (MELERO *et al.*,

2007). Foi demonstrado que os anticorpos monoclonais *anti-CTLA-4* prolongam a sobrevida de pacientes com melanoma maligno (HODI *et al.*, 2010).

A imunoterapia baseada na terapia celular adotiva utiliza células imunes isoladas do paciente, expandidas *ex vivo* e reintroduzidas no paciente. A maioria dessas terapias adotivas utilizam a estimulação de linfócitos com IL-2, para promover a ativação de células NK (CHOUDHRY *et al.*, 2018), bem como para gerar linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (SUN *et al.*, 2019).

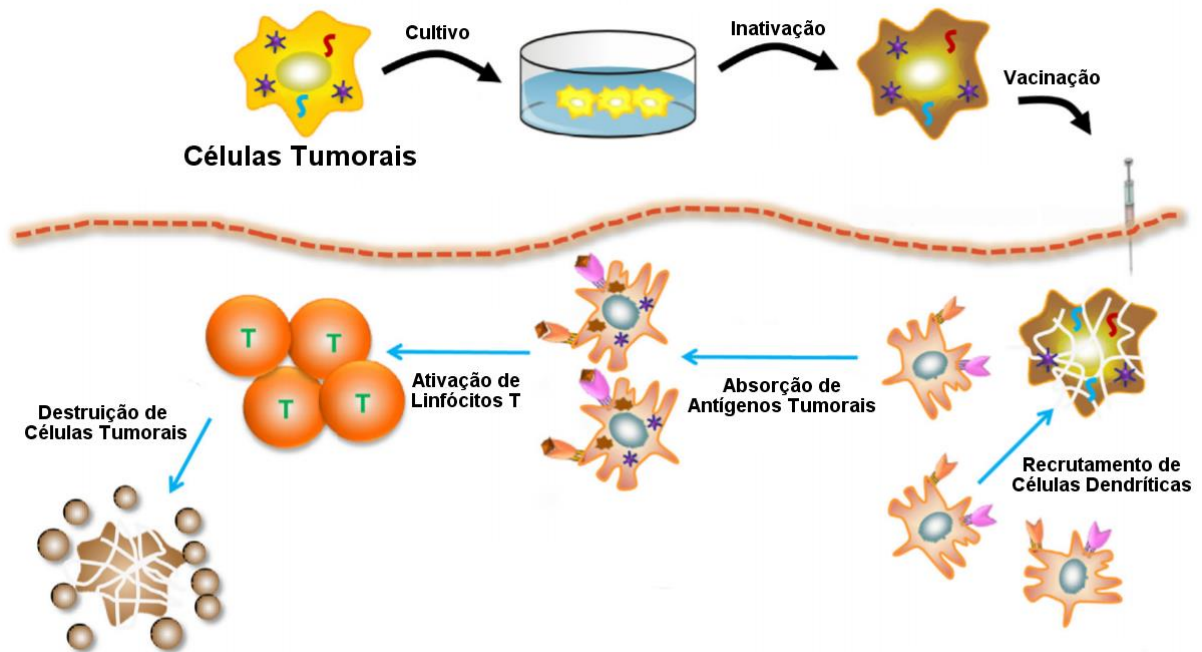
A imunoterapia ativa inclui a administração de células apresentadoras de antígeno profissionais e a administração de antígenos tumorais, lisados ou vacinas de células tumorais inteiras, para potencializar a resposta do próprio sistema imunológico do paciente contra os antígenos tumorais (GALLUZZI *et al.*, 2014).

Células dendríticas (DCs) autólogas, obtidas de monócitos do sangue periférico ou de precursores mieloides da medula óssea, são maturadas *ex vivo* através da exposição a um coquetel de citocinas (GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, PGE2 ou TNF α). Após a expansão, são carregadas com antígenos tumorais e reinjetadas no paciente, por via intradérmica ou subcutânea, onde irão se ligar e ativar linfócitos T (PALUCKA e BANCHEREAU, 2013).

Vacinas de células inteiras autólogas contra o câncer representam uma forma de imunoterapia antitumoral ativa e atualmente encontram-se em desenvolvimento clínico em diversas pesquisas. Esta técnica parte do princípio que as células tumorais contêm proteínas expressas nas lesões tumorais do paciente e podem fornecer vários antígenos tumorais para o reconhecimento imunológico (RAMIREZ-MONTAGUT, 2015).

Para a produção das vacinas de células inteiras, células tumorais autólogas são expandidas *ex vivo* e inativadas, normalmente por irradiação, para evitar o crescimento do tumor no local da injeção (KEENAN e JAFFEE, 2012). Assim que reintroduzidas no paciente, essas células são fagocitadas por células apresentadoras de antígenos infiltrantes no local da imunização e estimulam a produção de citocinas. Essas células apresentadoras de antígenos amadurecem e migram para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam os antígenos tumorais e ativam os linfócitos T (Figura 23) (KEENAN e JAFFEE, 2012; GUO *et al.*, 2013).

Figura 23 – Interações do sistema imunológico com o método imunoterápico utilizando vacina de células inteiras autólogas. Células dendríticas são atraídas para o local da vacinação, absorvendo o antígeno tumoral presente nas células injetadas. As células dendríticas processam e apresentam o antígeno para linfócitos T, via ligação MHC/TCR, promovendo a destruição das células tumorais no paciente.



Fonte: Adaptado de LIU *et al.* (2013).

Este tipo de vacina antitumoral com células inteiras torna-se ainda mais imunogênica quando as células tumorais são geneticamente modificadas para expressar citocinas, quimiocinas ou moléculas coestimulatórias para estimulação imunológica (SIMONS e SACKS, 2006; CHEN *et al.*, 2015). A inativação por irradiação também pode aumentar a imunogenicidade (LUO *et al.*, 2019).

Ao usar células tumorais inteiras, a resposta imune será direcionada a vários antígenos tumorais, diminuindo assim o risco de tolerância à terapia. O fator limitante das vacinas tumorais de células inteiras é a etapa demorada de cultura e expansão das células tumorais *in vitro*. (KEENAN e JAFFEE, 2012).

5.1.3. QUITOSANA COMO ADJUVANTE

Dado que a maioria das imunoterapias contra o tumor é baseada na vacinação com proteínas ou peptídeos, há a necessidade da utilização de adjuvantes que possam quebrar a tolerância a autoantígenos, assim como superar

a supressão imunológica local induzida pelo tumor. Adjuvantes são componentes adicionados a uma vacina que aumentam a respostas imunológica e são divididos em dois grupos: os potencializadores imunológicos e os sistemas de liberação (RAMIREZ-MONTAGUT, 2015).

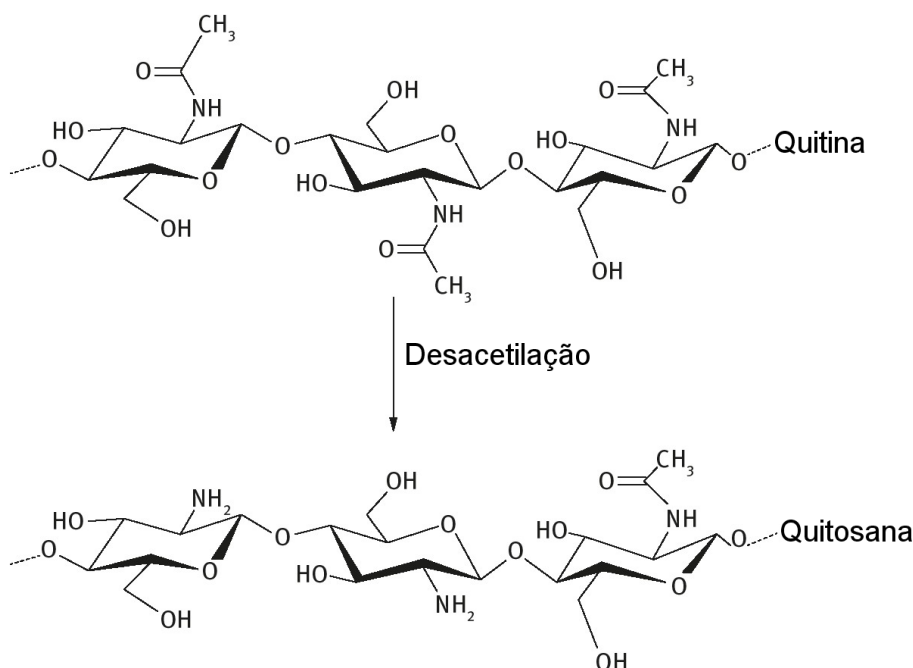
A ativação do sistema imunológico para benefício terapêutico é uma meta na imunologia há muito tempo, especialmente no tratamento do câncer. No entanto, como já dito anteriormente, os antígenos tumorais são geralmente autólogos e, portanto, pouco imunogênicos (MELLMAN *et al.*, 2011; VANNEMAN e DRANOFF, 2012).

O uso de polímeros biodegradáveis tem sido avaliado no aumento da imunogenicidade de antígenos em experimentos envolvendo o desenvolvimento de técnicas imunoterápicas contra o câncer. A administração destes polímeros, em conjunto com o antígeno de interesse, podem ativar efetivamente a resposta imune, atuando como potenciais adjuvantes vacinais (SHAKYA e NANDAKUMAR, 2013). Dentre os polímeros amplamente estudados recentemente para a substituição de adjuvantes convencionais, destaca-se a quitosana, um polímero catiônico natural de baixo custo, com alta biocompatibilidade e versatilidade em diferentes formulações (ZHAO *et al.*, 2014).

A quitosana é o segundo polímero natural mais abundante, antecedida apenas pela celulose, e é obtida a partir do processo de desacetilação da quitina em condições básicas, com hidróxido de sódio e alta temperatura (Figura 24). O resultado deste procedimento é a remoção dos grupos acetil da cadeia da molécula, formando um grupo amino e duas hidroxilas livres. O composto apresenta característica básica e é solúvel em ácido diluído, tal como ácido acético e ácido fórmico (KUMAR, 2000; ABDEL-FATTAH *et al.*, 2007).

A quitosana possui cargas positivas que interagem eletrostaticamente com os resíduos de ácido siálico presentes na superfície da mucosa, promovendo uma de suas características mais importantes, a mucoadesividade. Também tem por propriedade o auxílio na absorção de antígenos, já que afeta a permeabilidade da membrana epitelial provocando a abertura das junções entre as células epiteliais. Assim, o uso de quitosana vem sendo explorado em diferentes sistemas de liberação e tem demonstrado boa eficiência *in vivo*. (MOUEZ *et al.*, 2014).

Figura 24 – Fórmulas estruturais da quitina e da quitosana, ilustrando o processo de desacetilação para obtenção da quitosana, através de um processo de alcalinização da quitina, sob altas temperaturas.



Fonte: BEREZINA (2016).

A quitosana exibe propriedades que a caracterizam como um excelente adjuvante imunológico. Primeiro, a solução viscosa de quitosana cria um depósito de antígeno, em que 60% dos antígenos permanecem no local da injeção por 7 dias, contra menos de 9% de um antígeno proteico, após 8 horas de sua administração em solução salina. Em segundo, a quitosana é capaz de induzir uma expansão celular transitória em 67% nos linfonodos de drenagem, com o pico entre 14 e 21 dias após sua injeção. Terceiro, a quitosana aumenta os títulos de anticorpos específicos do antígeno, em mais de cinco vezes, e a proliferação esplênica de linfócitos T CD4⁺, específicos contra o antígeno, em seis vezes. Fortes aumentos nos títulos de anticorpos, juntamente com respostas robustas de hipersensibilidade retardada, revelam que a quitosana é capaz de induzir respostas imunes humorais e mediadas por células (ZAHAROFF, *et. al.*, 2006).

O efeito adjuvante da quitosana foi demonstrado pela primeira vez ainda na década 1980, com o estudo de Suzuki e colaboradores, em que a quitina e a quitosana exibiram um efeito protetor contra a infecção por *Candida albicans*, após a administração intraperitoneal de 50 mg/kg/dia dos compostos em camundongos (SUZUKI *et al.*, 1984).

Os estudos do grupo de pesquisa liderado por Nishimura (1984; 1985; 1986) provaram a atividade imunológica de derivados da quitina, após demonstrar que compostos obtidos a partir da desacetilação da quitina foram capazes de ativar macrófagos peritoneais *in vivo*, estimular a resistência não específica do hospedeiro à infecção por *Escherichia coli* em camundongos, induzida pela via subcutânea, além de promover a supressão do crescimento do fibrosarcoma murino Meth-A, em camundongos BALB/c, após a inoculação intradérmica de uma solução contendo uma mistura das células e dihidroxipropil-quitosana (NISHIMURA *et al.*, 1984).

Nanopartículas de quitosana podem ser utilizadas como carreadores de compostos ativos antitumorais, como doxorrubicina, paclitaxel, docetaxel e norcantaridina, seguros e eficazes (JARMILA e VAVRÍKOVÁ, 2011). Foi descrito na literatura a eficiência destas NPs na modulação do sistema imune, ao promover a maturação de DCs e posterior surgimento de células T CD8⁺ citotóxicas específicas contra o antígeno estudado (HAN *et al.*, 2016). NPs de quitosana também foram testadas como adjuvantes em vacinas contra o câncer, baseadas na glicoproteína MUC1, melhorando significativamente sua imunogenicidade (CHEN *et al.*, 2017). Em estudos com animais, a injeção intratumoral de quitosana associada a um plasmídeo que codifica o complexo de IL-12 murino em camundongos BALB/c, portadores de células da linhagem CT-26 de carcinoma de cólon, suprimiu o crescimento tumoral, a angiogênese e induziu significativamente a parada do ciclo celular e a apoptose das células neoplásicas (KIM *et al.*, 2016).

Especificamente para as células epiteliais do tecido vesical, as NPs de quitosana podem oferecer aplicações biomédicas versáteis, devido à capacidade desse polímero em anular temporariamente a atuação do urotélio como barreira protetora, permitindo a penetração das drogas em camadas celulares mais profundas (ERMAN e VERANIČ, 2018). O mesmo efeito foi observado por Illum e colaboradores (2001) ao estudar a capacidade de mucoadesão da quitosana, após administração na mucosa nasal, em que o polímero promoveu a abertura das junções das células endoteliais para o transporte da vacina.

Em estudos envolvendo o câncer de bexiga, a proliferação celular neste tipo de câncer foi inibida após a administração de nanosuspensões contendo NPs de quitosana associadas ao paclitaxel (LIU *et al.*, 2018). O efeito antiproliferativo da quitosana também foi verificado em células em células de diferentes linhagens, tais

como A375, SKMEL28, RPMI7951 e linhagem T24 de câncer de bexiga (KUPPUSAMY e KARUPPAIAH, 2012; GIBOT *et al.*, 2018).

Estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a utilização de um TPG, composto por quitosana e poloxamer 407, promoveu uma taxa de sobrevivência de 100% dos animais pós-instilação intravesical com células MB49 de carcinoma urotelial de bexiga. Essa ausência de desenvolvimento tumoral poderia ser explicada por um efeito inibidor da quitosana sobre células neoplásicas ou pelo desenvolvimento de uma resposta imunológica antitumoral intravesical.

Apesar da imunoterapia contra diversos tipos de câncer ter sido alvo de diversos estudos nos últimos anos, a baixa imunogenicidade das vacinas continua a ser um fator limitante nesta área. Desta maneira, pesquisas envolvendo a investigação da associação de técnicas imunoterápicas com adjuvantes imunogênicos, como a quitosana, podem ser de grande relevância para o estudo do tratamento do câncer.

5.2. OBJETIVOS

5.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se células MB49 embebidas em matriz de gel polimérico termorreversível com quitosana, usado na forma de um tratamento imunoterápico intravesical, estimulam resposta imunológica antitumoral e bloqueiam o desenvolvimento do tumor de bexiga em modelo murino ortotópico e singênico, utilizando camundongos C57BL/6.

5.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Verificar a indução de resposta imune sistêmica, após a imunização com TPG+MB49, por meio da avaliação da citotoxicidade de esplenócitos extraídos do baço dos animais co-cultivados com células MB49-GFP⁺, determinado por ensaios de viabilidade e pela liberação de LDH;
- ii. Analisar o efeito da imunoterapia na progressão tumoral, após a indução do modelo singênico e ortotópico de câncer urotelial de bexiga, acompanhando a evolução clínica e quantificando a área e o peso das bexigas acometidas pelos tumores.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Sob o registro número 4556170619 (Anexo C) na CEUA/UFSCar, 54 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com peso médio de 20g e sete semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto e mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia do DMP/UFSCar.

Toda a experimentação animal foi realizada no Laboratório de Imunologia Aplicada do DGE/UFSCar e os protocolos experimentais foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa animal adotados pela CEUA/UFSCar, após o período de adaptação dos animais ao novo ambiente.

5.3.2. PREPARAÇÃO DO TPG E CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

O sistema de liberação proposto para a comparação da taxa de desenvolvimento tumoral, no momento da inoculação intravesical de células MB49, consiste em um sistema polimérico binário composto por poloxamer 407 e quitosana (Tabela 6), conforme descrito por Gratieri (2010).

Células tumorais da linhagem MB49 foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Vitrocell Embriolife). Após a manutenção da cultura celular em estufa incubadora, a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, a confluência da monocamada celular foi observada até atingir 90%. As células aderentes foram removidas da superfície das garrafas com tripsina 2,5% (Life Technologies) e a quantificação celular direta foi realizada com azul de *Trypan* 0,4% (Life Technologies) em câmara de Neubauer.

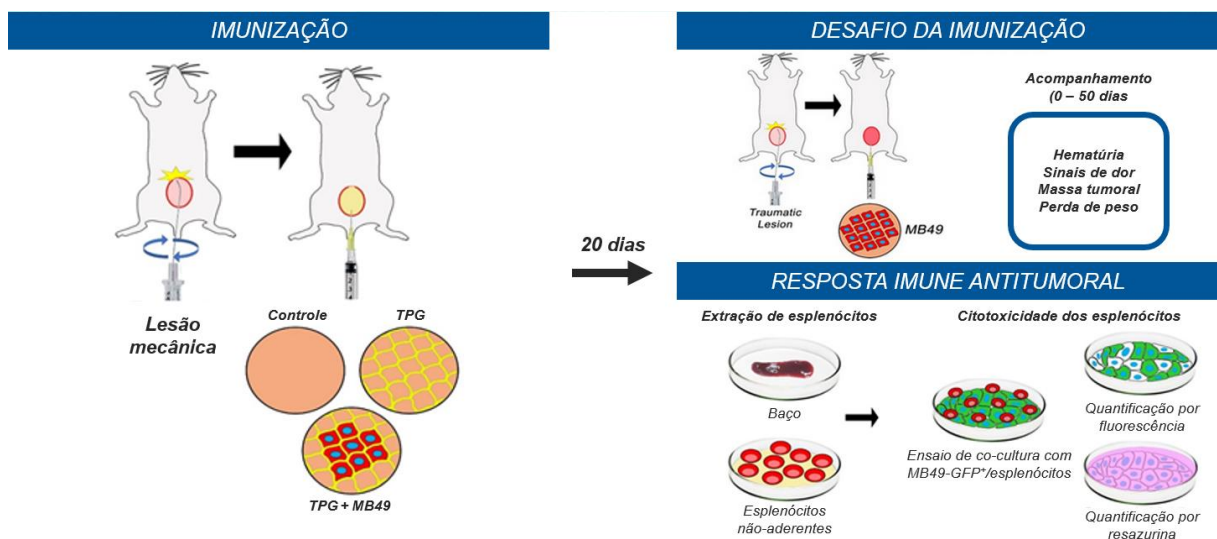
5.3.3. IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS COM MB49 E TPG

Todos os 50 animais foram previamente anestesiados, por via intraperitoneal, com 100 µL de uma solução contendo cloridrato de cetamina (90 mg/kg, Dopalen[®], Ceva) e xilazina (10 mg/kg, Anasedan[®], Ceva), e um algodão embebido com soro fisiológico foi colocado em contato com os olhos dos animais.

Sob efeito dos anestésicos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à cateterização transuretral com cateter intravenoso de polietileno de 24 G (0,7x19 mm), sem agulha, e ampla lubrificação com vaselina. Após o esvaziamento da bexiga, a lesão mecânica do epitélio vesical foi induzida em todos os animais, com o auxílio de uma agulha com a ponta curvada (5 a 7 graus), inserida no cateter e rotacionada por 5 vezes (YANG *et al.*, 2012).

Para a imunização com o TPG e posterior desafio com as células tumorais, os camundongos obtidos foram divididos em três grupos (Figura 25): Grupo C1 (n = 18 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo 50 µL de suspensão celular a 1×10^5 células MB49 em DMEM por camundongo e 50 µL de TPG (concentração de 50%); Grupo C2 (n = 18 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo 50 µL de meio DMEM e 50 µL de TPG (concentração de 50%); Grupo C3 (n = 18 animais), com a inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo apenas DMEM, sem a presença de nenhum sistema de liberação ou indução tumoral.

Figura 25 – Fluxograma da metodologia de experimentação para imunização utilizando células MB49 e TPG no momento da inoculação intravesical. Os camundongos foram submetidos à indução mecânica da lesão e divididos em três grupos: Grupo TPG+MB49 (n = 18); Grupo TPG (n = 18); e Grupo Controle (n = 18). Após 21 dias, 15 animais de cada grupo foram submetidos à uma nova indução mecânica da lesão, seguida pela indução tumoral, a fim de analisar a progressão tumoral e crescimento vesical pós-desafio. Os 3 animais restantes de cada grupo foram eutanasiados, para que o tecido esplênico fosse coletado e a citotoxicidade dos esplenócitos fosse determinada.



Fonte: O autor (2020).

Após o procedimento de inoculação intravesical, os animais foram mantidos em decúbito dorsal e, cerca de 45 minutos após o início do procedimento de anestesia, os cateteres foram removidos. Os animais foram mantidos em observação durante 21 dias, em que os sintomas correspondentes ao desenvolvimento tumoral foram observados diariamente.

5.3.4. DESAFIO *IN VIVO* DA IMUNIZAÇÃO COM CÉLULAS TUMORAIS

Decorridos 21 dias da instilação inicial, 15 animais de cada grupo (C1, C2 e C3, n = 45 animais) passaram por um novo procedimento de anestesia, cateterização transuretral, indução mecânica da lesão no epitélio vesical e inoculação intravesical de células tumorais, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Essa nova instilação teve por objetivo desafiar a imunização prévia dos animais, induzindo o modelo singênico e ortotópico de câncer urotelial de bexiga, por meio da inoculação intravesical de 100 µL de uma solução contendo apenas suspensão celular a 1×10^5 células MB49 por camundongo.

Para a determinação da progressão tumoral e a taxa de crescimento vesical pós-desafio, os animais foram mantidos em observação durante até 35 dias, em que os sintomas correspondentes ao desenvolvimento tumoral foram observados diariamente. A sobrevida cumulativa destes 45 animais desafiados também foi analisada.

5.3.5. EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO VESICAL

Assim que o animal apresentou os sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral, como hematúria, dor, presença de massa palpável na região pélvica ou diminuição do peso do animal, o mesmo foi eutanasiado por sobredosagem intraperitoneal da associação de cloridrato de cetamina (270 mg/kg, Dopalen[®], Ceva) com xilazina (30 mg/kg, Anasedan[®], Ceva).

O tecido vesical dos animais foi coletado, seguindo os mesmos procedimentos de colheita histopatológica descritos anteriormente, e os cadáveres dos animais foram mantidos em freezer -80°C, até o recolhimento pelo serviço de coleta de resíduos de serviços de saúde.

A amostra de tecido vesical coletada foi acondicionada em um recipiente com formalina neutra tamponada a 10%, por 16 horas e ao abrigo da luz. Os tecidos fixados foram então lavados com água destilada e transferidos para um tubo contendo álcool 70°. As bexigas fixadas foram fotografadas para a análise do crescimento vesical, em que o tamanho das bexigas de cada grupo foi comparado.

5.3.6. EUTANÁSIA E EXTRAÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO

Os 3 animais restantes de cada grupo (C1, C2 e C3, n = 9 animais), que não passaram pelo desafio da imunização prévia, foram eutanasiados por sobredosagem intraperitoneal da associação de cloridrato de cetamina (270 mg/kg, Dopalen®, Ceva) com xilazina (30 mg/kg, Anasedan®, Ceva). O tecido vesical, bem como o tecido esplênico de cada animal foi coletado, seguindo os mesmos procedimentos de colheita histopatológica e descarte de cadáveres descritos anteriormente.

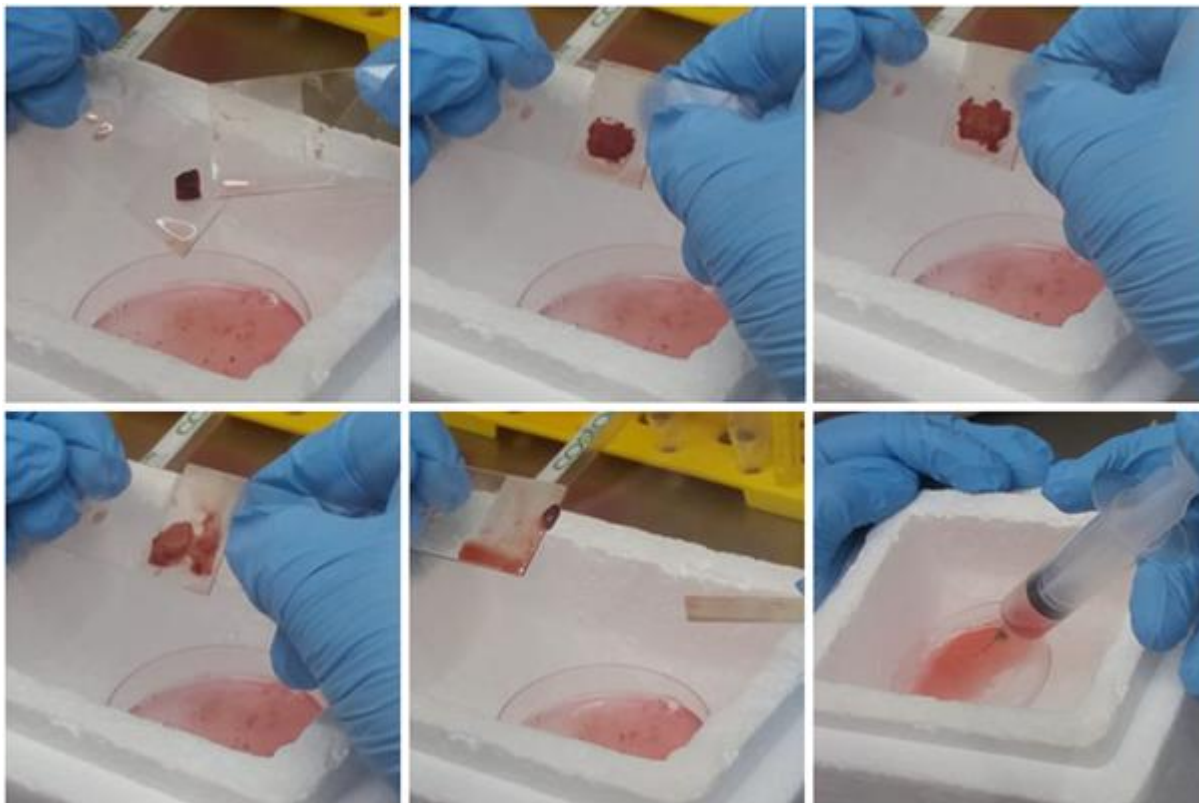
A amostra esplênica coletada de cada animal foi seccionada em três partes e acondicionada em uma placa de petri, contendo meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), suplementado com β -mercaptoetanol 0,05 mM. As amostras foram agrupadas, de acordo com o grupo em questão.

5.3.7. EXTRAÇÃO DE ESPLÊNOCITOS

Para a extração de esplenócitos, as placas foram mantidas sobre gelo e as amostras foram comprimidas utilizando a parte rugosa de duas lâminas de microscopia. O homogenato esplênico obtido foi lavado com o próprio meio da placa e ressuspendido com seringas e agulhas de tamanho decrescente (18 G, 22 G e 26 G, respectivamente), até que se obtivesse uma solução homogênea (Figura 26).

As amostras esplênicas de cada grupo foram acondicionadas em tubos e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o conteúdo de cada tubo foi ressuspendido em 360 μ L de água destilada filtrada, durante 10 segundos, a fim de promover hemólise, seguida pela adição de 40 μ L de PBS 10x filtrado. O procedimento de centrifugação, seguido pelo procedimento de hemólise, foi repetido por três vezes.

Figura 26 – Procedimento de extração de esplenócitos por meio do método de compressão das amostras de tecido esplênico. O baço foi seccionado em três partes, acondicionado em placa de petri sobre gelo, comprimido utilizando a parte rugosa de duas lâminas de microscopia e, por fim, o homogenato obtido foi lavado e ressuspensado até a obtenção de uma solução homogênea.



Fonte: O autor (2020).

As amostras esplênicas dos três grupos (C1, C2 e C3) foram então plaqueadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia), suplementado com β -mercaptoetanol 0,05 mM, 10% de SFB (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL (Vitrocell Embriolife).

Após 2 horas de cultivo em estufa incubadora, a 37°C e com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e transferido para uma nova placa de 6 poços, contendo meio de cultivo, SFB e antibióticos, nas mesmas concentrações utilizadas previamente.

Este sobrenadante recolhido de cada poço, contendo os esplenócitos, foi então quantificado, através do método de quantificação celular direta com azul de *Trypan* 0,4% (Life Technologies), em câmara de Neubauer. Após a quantificação, a cultura de esplenócitos foi mantida em estufa incubadora, a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, até o momento de sua utilização para o ensaio de co-cultivo no dia seguinte.

5.3.8. ENSAIO DE CO-CULTIVO DE CÉLULAS TUMORAIS E ESPLÊNOCITOS

Células tumorais da linhagem MB49, marcadas com proteína verde fluorescente (GFP), foram plaqueadas em microplacas de 96 poços (5×10^4 células por poço), contendo meio DMEM com alta concentração de glicose e 2 mmol/L de L-glutamina (Cultilab), suplementado com 10% de SFB (Cultilab) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Vitrocell Embriolife).

A cultura de células MB49-GFP⁺ foi mantida em estufa incubadora, a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, *overnight*. Após este período, o sobrenadante de cada poço foi removido e uma solução contendo os esplenócitos previamente obtidos foi pipetada, nas proporções de 1:10 e 1:50 (MB49-GFP⁺/esplenócitos) e em quadruplicata.

5.3.9. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO POR ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA

A co-cultura celular de MB49-GFP⁺ e esplenócitos foi utilizada, após 24 horas de cultivo em estufa incubadora a 37°C com atmosfera de dióxido de carbono a 5%, para a análise de citotoxicidade dos esplenócitos. Para isso, o sobrenadante de cada poço foi delicadamente recolhido, acondicionado em microtubos e armazenados em freezer -20°C, para posterior ensaio da atividade enzimática de lactato desidrogenase (LDH). Os poços foram então lavados com PBS à temperatura ambiente.

Para que não houvesse interferência na análise por fluorescência, um meio DMEM, com alta concentração de glicose e sem vermelho de fenol (Thermo Fisher Scientific), foi adicionado em cada poço. A microplaca foi transportada imediatamente para a quantificação da citotoxicidade dos esplenócitos em microscópio automático ImageXpress[®] Micro XLS (Molecular Devices).

5.3.10. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO POR ENSAIO DE RESAZURINA

A quantificação da citotoxicidade dos esplenócitos também foi determinada por meio do ensaio de resazurina. Logo após a análise por microscopia de fluorescência, os poços foram novamente lavados com PBS à temperatura ambiente e a viabilidade

celular analisada através da adição de 180 μL de uma solução com meio DMEM (Cultilab) contendo 70 μM de resazurina (Sigma-Aldrich) em cada poço.

A microplaca foi novamente incubada em estufa incubadora e ao abrigo da luz, por 3 horas, a fim de permitir a metabolização da resazurina. Assim que a solução passou de uma coloração azul para rosa, 150 μL do meio de cada poço foram transferidos para uma outra microplaca de 96 poços. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 570 nm e 600 nm como referência, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340[®], Biochrom).

5.3.11. ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO CO-CULTIVO PELA LIBERAÇÃO DE LDH

Os sobrenadantes do ensaio de co-cultivo com os esplenócitos, obtidos dos animais pertencentes aos grupos C1, C2 e C3, foram recolhidos e armazenados previamente. Os microtubos foram descongelados e utilizados para a determinação da atividade enzimática de lactato desidrogenase (LDH) em cada amostra.

Após o descongelamento, 50 μL de cada sobrenadante foram pipetados por poço em uma microplaca de 96 poços, juntamente com 100 μL de uma solução contendo o substrato piruvato (6 mmol/L, em conjunto com tampão 250 mmol/L e azida sódica 14,6 mmol/L) e a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (0,36 mmol/L, em conjunto com azida sódica 14,6 mmol/L) em seu estado reduzido (NADH), na proporção de 1:4 (substrato/coenzima).

A atividade catalítica da LDH, responsável por catalisar a conversão do piruvato em lactato com uma concomitante oxidação do NADH para NAD^+ , foi determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido no comprimento de onda de 340 nm. A densidade óptica foi monitorada usando um leitor de microplacas (Asys UVM 340[®], Biochrom) e o decréscimo da absorbância foi considerado proporcional à atividade de LDH na amostra.

5.3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de um ou dois fatores por meio do *software* Prism[®], versão 5.0 (GraphPad Software). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e, em

todas as análises, foram adotados 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

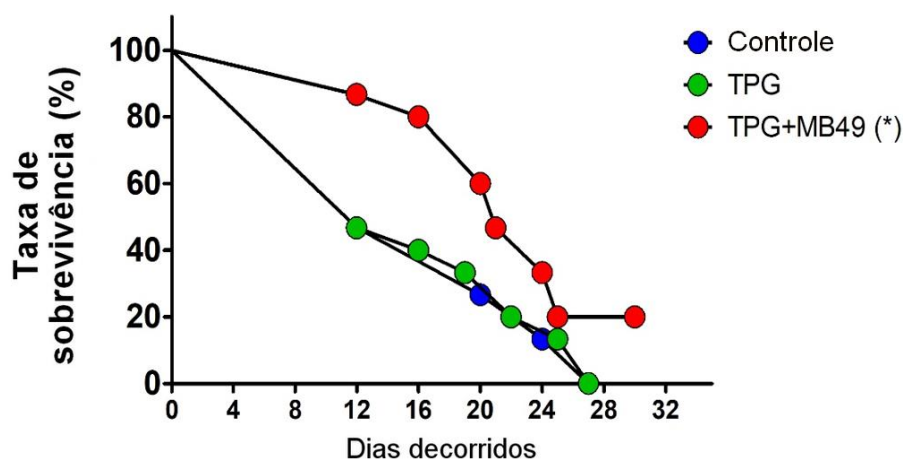
As análises das curvas de sobrevivência foram feitas pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* por meio do software Prism[®], versão 5.0 (GraphPad Software). As comparações entre as taxas de crescimento vesical foram realizadas pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O número de animais (n) utilizado neste Capítulo foi calculado com base na distribuição binomial e considerando uma eficiência de 70% no desenvolvimento de tumores no grupo controle, sem tratamento.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. ANÁLISE DA PROGRESSÃO TUMORAL PÓS-IMUNIZAÇÃO

A investigação da hipótese do potencial efeito imunogênico do gel polimérico termorreversível com quitosana, dentro do ambiente vesical, iniciou-se com o desafio da imunização dos camundongos C57BL/6. O desafio foi realizado 21 dias após a imunização com TPG+MB49, pois é descrito na literatura que o auge da promoção da resposta imune mediada por células, após a administração da quitosana, está entre 14 e 21 dias pós-injeção (ZAHAROFF, *et. al.*, 2006). A sobrevida cumulativa dos animais foi analisada após a indução do modelo ortotópico e singênico de carcinoma urotelial de bexiga (Figura 27).

Figura 27 – Sobrevida cumulativa dos animais, previamente imunizados (Grupo TPG+MB49, n = 15) ou não imunizados (Grupos TPG, n = 15, e Controle, n = 15) com TPG, após o desafio com células MB49 (1×10^5 células/camundongo). Os animais foram acompanhados durante 30 dias, sendo observado o aparecimento de sinais correspondentes ao desenvolvimento tumoral. Os grupos foram estatisticamente comparados pelo método de *Kaplan Mier* associado ao teste de *Gehan-Breslow-Wilcoxon* ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em comparação com o grupo controle.



Fonte: O autor (2020).

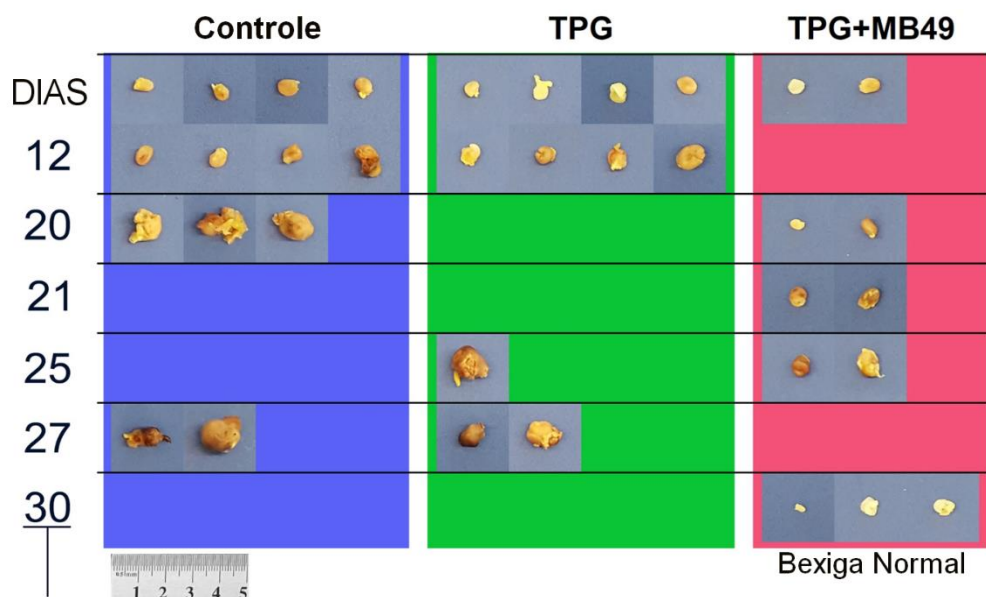
O aparecimento dos sintomas correspondentes ao desenvolvimento tumoral foi observado mais rapidamente nos animais dos grupos não imunizados, com animais apresentando hematúria ou sinais de dor já no 11º dia após o desafio. A realização da eutanásia dos primeiros animais foi necessária no 12º dia, em que 8 animais de cada grupo não imunizado (n = 16) e 2 animais do grupo imunizado foram eutanasiados, por sobredosagem de anestésicos.

O acompanhamento dos animais mostrou que no grupo em que houve a imunização prévia com TPG e MB49, a taxa de sobrevivência final, após 30 dias, foi de 20%. Esta taxa foi significativamente maior neste grupo, após a comparação aos grupos não imunizados, em que não houve sobreviventes após 30 dias de acompanhamento. Esse padrão de sobrevivência seguiu o mesmo encontrado no experimento realizado no Capítulo 2 (Figura 18), no grupo em que os animais foram submetidos aos procedimentos de indução tumoral com TPG+MB49.

Também é possível notar que a curva de sobrevivência dos animais imunizados previamente, apresentava uma progressão linear, porém decaiu rapidamente após o 16º dia da indução. É provável que a resposta imune específica antitumoral gerada não foi suficiente para conter o avanço da doença, visto que o modelo utilizado para a indução tumoral, com células MB49, é considerado um dos mais efetivos e bem estabelecidos modelos murinos de indução de câncer de bexiga singênico e ortotópico descritos na literatura (GÜNTHER *et al.*, 1999; LOSKOG *et al.*, 2005; DOBEK e GODBEY, 2011).

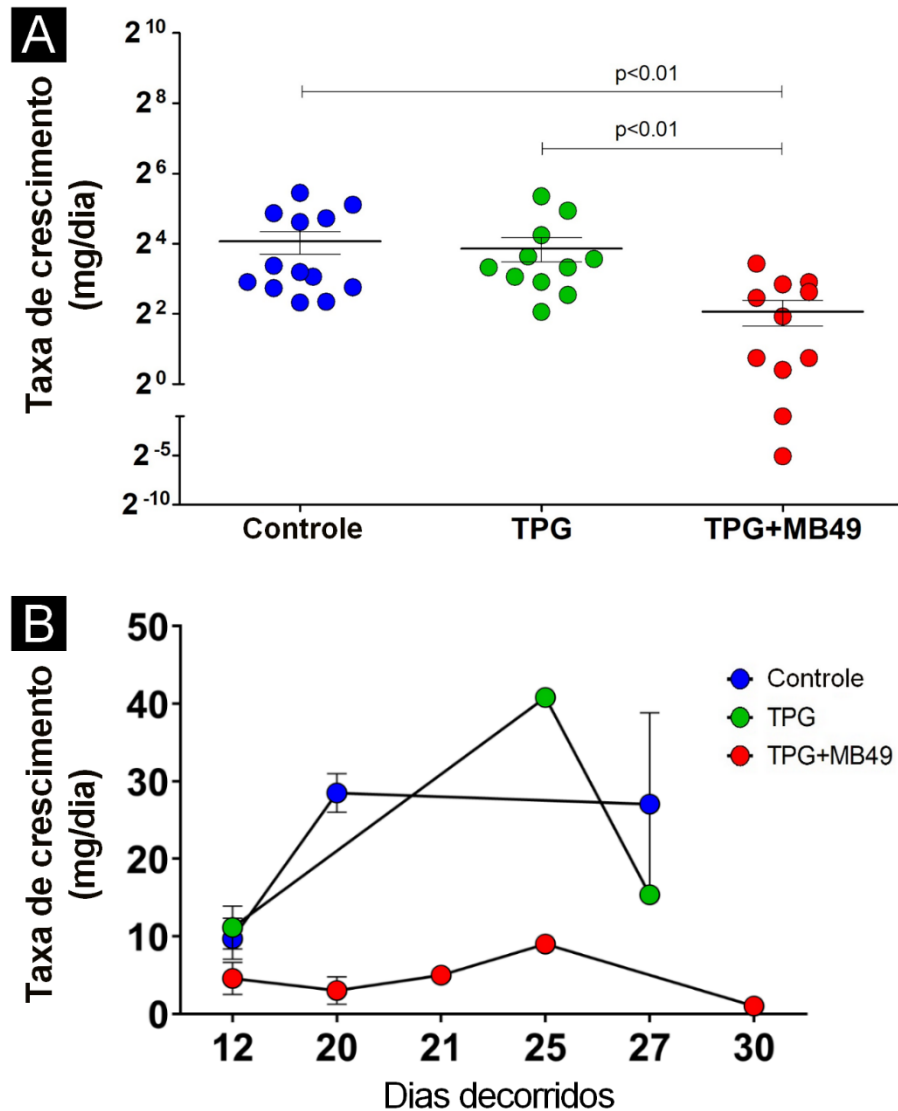
Após a extração da bexiga dos animais eutanasiados, foi possível comparar visualmente o tamanho vesical entre os grupos. Analisando a Figura 28, é possível observar que, em média, as bexigas do grupo previamente imunizado (TPG+MB49) são menores que as bexigas pertencentes aos demais grupos.

Figura 28 – Imagens fotográficas das bexigas extraídas dos animais após eutanásia. Os animais foram previamente imunizados (Grupo TPG+MB49) ou não imunizados (Grupos TPG e Controle) com TPG. Após 20 dias, foi realizado o desafio da imunização com células MB49 (1×10^5 células/camundongo) e os animais foram acompanhados durante 30 dias.



A coleta do tecido vesical também nos permitiu identificar que o peso e o tamanho de cada bexiga estão relacionados ao dia em que o animal foi eutanasiado. Observa-se um crescimento significativamente menor das bexigas (medidas pelo peso em relação ao tempo) pertencentes aos animais do grupo imunizado previamente com TPG e células MB49, quando comparadas aos demais grupos não imunizados (Figura 29).

Figura 29 – Análise da taxa de crescimento vesical, após imunização e posterior indução do modelo singênico e ortotópico de câncer urotelial de bexiga, em camundongos C57BL/6. Os animais foram previamente imunizados (Grupo TPG+MB49) ou não imunizados (Grupos TPG e Controle) com TPG e desafiados com células MB49 (1×10^5 células/camundongo). A taxa de crescimento vesical foi calculada, dividindo o peso da bexiga pelo valor em dias da indução até a eutanásia nos animais. Análise estatística realizada por meio do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn* ($p < 0,01$).



Fonte: O autor (2020).

A agressividade no desenvolvimento tumoral do modelo experimental de indução, utilizado neste trabalho, pode ser explicado pela quantidade de células MB49 (1×10^5 células por camundongo) inoculadas intravesicalmente para produzir o tumor, sendo maior que a encontrada na maioria dos trabalhos. Caso a quantidade de células inoculadas fosse menor, provavelmente o decaimento da curva de sobrevivência para os animais imunizados também seria menor.

Um outro fator a ser analisado é a influência da lesão da membrana mucosa da bexiga urinária induzida no momento da inoculação intravesical, pois ao mesmo tempo em que é favorável para a indução tumoral, por facilitar a adesão das células MB49 inoculadas no tecido vesical, como descrito nos resultados do estudo de Yang e colaboradores (2012), também pode favorecer indiretamente a imunização devido à ativação do sistema imune. A ativação da resposta imune aguda em decorrência de traumas, ocorre com a produção e liberação de substâncias endógenas pelas células mortas ou danificadas, denominadas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Estes sinais de perigo induzem a sinalização intracelular em leucócitos via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), gerando uma resposta imune celular instantânea. Posteriormente, ocorrerá o recrutamento de DCs, responsáveis por captar antígenos não-próprios e ativar linfócitos B e T, gerando assim uma resposta imune específica (OSUKA *et al.*, 2014; HUBER-LANG *et al.*, 2018).

Entretanto, esse não parece ser um mecanismo importante em nosso trabalho, uma vez que os animais pertencentes ao grupo controle e ao grupo TPG sofreram o mesmo trauma, durante o tratamento imunoterápico, mas evoluíram de forma desfavorável, seguindo um padrão similar ao encontrado no experimento realizado no Capítulo 2 (Figura 18). Nem mesmo a presença do TPG, quando inoculado sem as células MB49, estimulou uma resposta antitumoral.

A ausência da resposta antitumoral após a administração somente da quitosana, pode ser explicada pelo tipo de resposta imune gerada quando a quitosana é administrada sem a presença dos antígenos tumorais, em que uma resposta imune inata não específica pode ter ocorrido (BUETER *et al.*, 2013; LANCTÔT *et al.*, 2017). Ainda na década de 1990, Marcinkiewicz e colaboradores demonstraram que a resposta imune induzida pela quitina e quitosana é determinada pela presença do antígeno, em que a administração da quitosana sozinha, por via intraperitoneal em camundongos, aumentou significativamente a resposta imune humoral, mas não a resposta imune mediada por células (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1991).

A concentração de TPG utilizada na imunização também pode exercer um fator relevante na promoção da imunização dos animais, dado que a concentração ou o pH da solução utilizada provoca a morte de grande parte das células, como mostrado nos experimentos de viabilidade e de proliferação, tornando a imunoterapia mais imunogênica ao sistema imune. A modulação da imunogenicidade, após a indução de morte celular, foi descrita por Luo e colaboradores (2019) em experimento envolvendo células da linhagem A529 de câncer de pulmão, no qual comparou a administração de uma vacina antitumoral de células inteiras, mortas por irradiação, com a administração de células não irradiadas, confirmando que a irradiação aumentou a imunogenicidade desse tipo de vacina ao promover o aumento da resposta de linfócitos T específicos para o tumor *in vivo*.

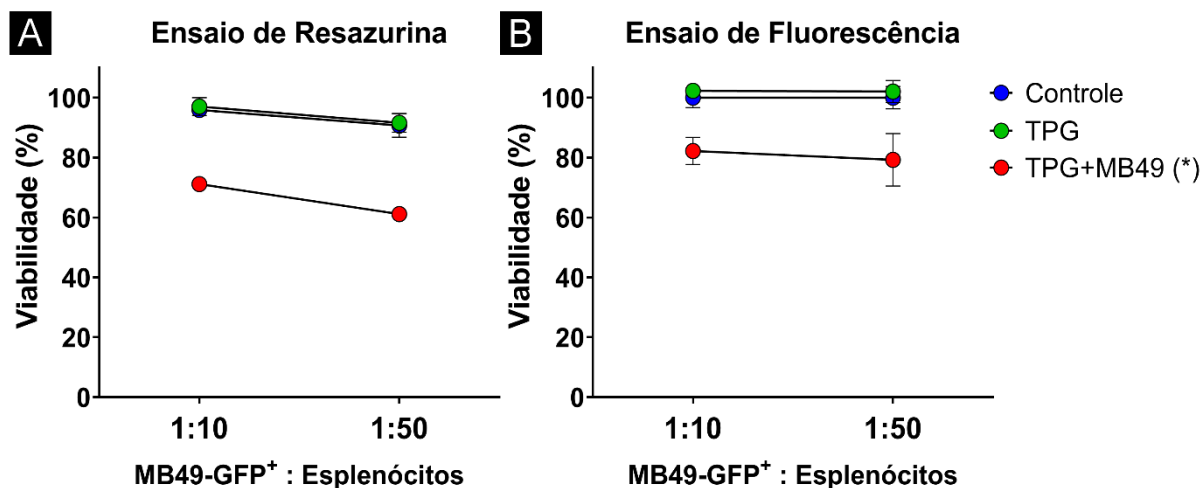
A concentração de TPG inoculada também estabelece a quantidade de quitosana liberada no ambiente tumoral, portanto, a diminuição ou o aumento dessa concentração pode afetar favorável ou desfavoravelmente a taxa de sucesso da imunização, o que pode ser avaliado em futuros experimentos.

Como já mencionado anteriormente, a quitosana é um promissor adjuvante de vacinas, pois apresenta alta biocompatibilidade (ZHAO *et al.*, 2014), promove o aumento das respostas imunes humoral e mediada por células e também forma um depósito, em que antígenos misturados com gel de quitosana e inoculados podem permanecer no local da injeção por até 7 dias, até a metabolização da quitosana. Todas essas características criam um cenário ideal para a imunoterapia: um depósito de antígeno, em um local de inflamação, que introduz os sinais críticos de perigo e coestimulação para gerar uma resposta imune adaptativa (ZAHAROFF, *et al.*, 2006).

5.4.2. QUANTIFICAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS ESPLÊNOCITOS CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS TUMORAIS

Além da análise do tecido vesical, o tecido esplênico de animais de cada grupo também foi extraído e analisado, em que a citotoxicidade dos esplenócitos foi quantificada por meio de um ensaio de co-cultivo com células MB49 marcadas com GFP (Figura 30). Esplenócitos coletados de camundongos imunizados também foram utilizados por Bauer e colaboradores (2016) para avaliar a citotoxicidade antitumoral, demonstrando efeito citotóxico significativo contra células de neuroblastoma (N2a), através de análise por citometria.

Figura 30 – Análise da taxa de citotoxicidade dos esplenócitos, após o co-cultivo com as células MB49-GFP⁺. Células tumorais da linhagem MB49-GFP⁺ foram plaqueadas em microplacas e mantidas em estufa incubadora overnight. Após este período, o sobrenadante foi removido e os esplenócitos foram pipetados, nas proporções de 1:10 e 1:50 (MB49-GFP⁺/esplenócitos) e em quadruplicata. A análise da citotoxicidade foi realizada (A) por ensaio de resazurina e (B) por microscopia de fluorescência, através do equipamento ImageXpress. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA de dois fatores ($p < 0,005$). Asterisco denota significância estatística em relação ao grupo controle.



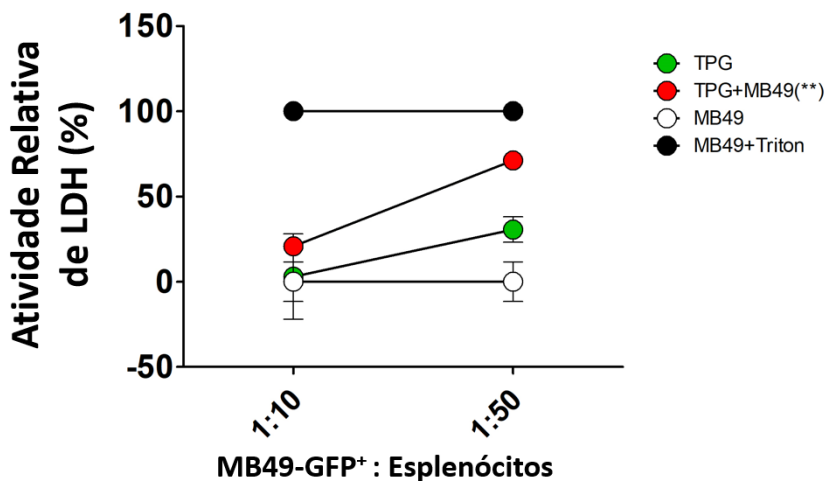
Fonte: O autor (2020).

O experimento de co-cultivo, analisado por ensaio de resazurina, demonstrou que a taxa de citotoxicidade dos esplenócitos foi significativamente maior no grupo previamente imunizado com o gel polimérico termorreversível em conjunto com células tumorais MB49, principalmente na proporção de 1:50 (Figura 30A). A análise da citotoxicidade também foi quantificada por microscopia de fluorescência e ilustrou o mesmo perfil de resposta, em que os esplenócitos do grupo previamente imunizado também demonstraram maior atividade frente às células MB49 (Figura 30B).

5.4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELA LIBERAÇÃO DE LDH

O experimento colorimétrico da atividade enzimática de LDH foi realizado para comprovar a morte celular promovida pelos esplenócitos às células MB49, após o co-cultivo (Figura 31), já que quanto maior a presença de LDH nas amostras, maior a quantidade de células que sofreram o rompimento da membrana celular. A permeabilização da membrana plasmática é um importante marcador de necrose e pode ser quantificada *in vitro*, medindo a liberação da enzima lactato desidrogenase na amostra, como descrito por Chan e colaboradores (2013).

Figura 31 – Avaliação da citotoxicidade pelo método colorimétrico de liberação da enzima lactato desidrogenase. O sobrenadante de cada grupo foi pipetado em microplaca, juntamente com uma solução contendo o substrato (tampão, piruvato e azida sódica) e a coenzima (NADH e azida sódica). A densidade óptica foi monitorada usando um leitor de microplacas e o decréscimo da absorbância será proporcional à quantidade de LDH liberada na amostra. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA de dois fatores ($p < 0,005$). Asteriscos denotam significância estatística em relação ao grupo controle.



Fonte: O autor (2020).

Para o experimento colorimétrico da atividade enzimática de LDH nos sobrenadantes recolhidos dos poços em que os esplenócitos foram co-cultivados com células MB49-GFP⁺, um grupo de células MB49 tratadas com Triton foi considerado controle para morte celular. Os resultados desta análise mostram que o grupo previamente imunizado com TPG e MB49 apresenta uma taxa de atividade de LDH, em ambas as concentrações de esplenócitos (1:10 e 1:50), significativamente maior que nos grupos em que não foi realizada a imunização prévia.

Os resultados encontrados propõem a possibilidade do desenvolvimento de uma imunoterapia antitumoral com células inteiras inativadas, utilizando um gel polimérico termorreversível, compostos por poloxamer 407 e quitosana, como adjuvante, para o tratamento do carcinoma urotelial de bexiga.

5.5. CONCLUSÕES

Células MB49 embebidas em matriz de gel polimérico termorreversível com quitosana, usadas como uma imunoterapia intravesical, são capazes de estimular resposta imune sistêmica e afetar o desenvolvimento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo murino C57BL/6 ortotópico singênico.

5.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, W. I.; JIANG, T.; EL-BASSYOUNI, G. T.; *et al.* **Synthesis, characterization of chitosan and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering.** Acta Biomaterialia, v. 3, n. 4, p. 503-514, 2007.

BAUER, D. F.; PEREBOEVA, L.; GILLESPIE, G. Y. *et al.* **Effect of HSV-IL12 loaded tumor cell-based vaccination in a mouse model of high-grade neuroblastoma.** Journal of immunology research, v. 2016, p. 2568125, 2016.

BEREZINA, N. **Production and application of chitin.** Physical Sciences Reviews, v. 1, n. 9, p. 1-8, 2016.

BUETER, C. L.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M. **Innate sensing of chitin and chitosan.** PLOS Pathogens, v. 9, n. 1, p. e1003080, 2013.

BURNET, F. M. **Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications.** The BMJ, v. 1, n. 5023, p. 841-847, 1957.

BURNET, F. M. **The concept of immunological surveillance.** Progress in Experimental Tumor Research, v. 13, p. 1-27, 1970.

CAICEDO-CARVAJAL, C. E.; LIU, Q.; GOY, A. *et al.* **Three-dimensional cell culture models for biomarker discoveries and cancer research.** Translational Medicine, v. 1, p. 1-8, 2012.

CALMETTE, A.; GUERIN, C.; BOQUET, A. *et al.* **La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG".** Paris: Masson et cie, 1927, 250p.

CHAN, F. K.; MORIWAKI, K.; DE ROSA, M. J. **Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity.** Methods in Molecular Biology, v. 979, p. 65-70, 2013.

CHEN, M.; XIANG, R.; WEN, Y. *et al.* **A whole-cell tumor vaccine modified to express fibroblast activation protein induces antitumor immunity against both**

tumor cells and cancer-associated fibroblasts. Scientific Reports, v. 5, p. 14421, 2015.

CHEN, P.; HUANG, Z.; SUN, Z. *et al.* **Chitosan nanoparticles based nanovaccines for cancer immunotherapy,** Pure and Applied Chemistry, v. 89, n. 7, p. 931-939, 2017.

CHOUHRY, H.; HELMI, N.; ABDULAAL, W. H. *et al.* **Prospects of IL-2 in cancer Immunotherapy.** BioMed Research International, v. 2018, p. 9056173, 2018.

COLEY, W. B. II. **Contribution to the knowledge of sarcoma.** Annals of Surgery, v. 14, n. 3, p. 199-220, 1891.

COLEY, W. B. **The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the streptococcus erysipelas and the bacillus prodigiosus).** Proceedings of the Royal Society of Medicine, v. 3, p. 1-48, 1910.

DOBEK, G. L.; GODBEY, W. T. **An orthotopic model of murine bladder cancer.** Journal of Visualized Experiments, v. 48, p. 2535, 2011.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H. *et al.* **Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape.** Nature Immunology, v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. **The three Es of cancer immunoediting.** Annual Review of Immunology, v. 22, p. 329-360, 2004.

EHRlich, P. **Über den jetzigen stand der karzinomforschung.** Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie, v. 5, 117-164, 1909.

ERMAN, A.; VERANIČ, P. **The use of polymer chitosan in intravesical treatment of urinary bladder cancer and infections.** Polymers, v. 10, n. 3, p. 265, 2018.

GALLUZZI, L.; VACCHELLI, E.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M. *et al.* **Classification of current anticancer immunotherapies.** Oncotarget, v. 5, n. 24, p. 12472-12508, 2014.

GIBOT, L.; CHABAUD, S.; BOUHOUT, S. *et al.* **Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 370-379, 2015.

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. **Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression.** Genes & Development, v. 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 2018.

GRATIERI, T. **Sistemas de liberação ocular contendo fluconazol: obtenção, caracterização e liberação passiva e iontoforética *in vitro* e *in vivo*.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. **Clonal evolution in cancer.** Nature. v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012.

GÜNTHER, J. H.; JURCZOK, A.; WULF, T. *et al.* **Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49).** Cancer Research, v. 59, n. 12, p. 2834-2837, 1999.

GUO, C.; MANJILI, M. H.; SUBJECK, J. R. *et al.* **Therapeutic cancer vaccines: Past, present, and future.** Advances in Cancer Research, v. 119, p. 421-475, 2013.

HAN, H.; BYEON, Y.; JANG, J. *et al.* ***In vivo* stepwise immunomodulation using chitosan nanoparticles as a platform nanotechnology for cancer immunotherapy.** Scientific Reports, v. 6, p. 38348, 2016.

HASEGAWA, M.; YAGI, K.; IWAKAWA, S. *et al.* **Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells.** Japanese Journal of Cancer Research, v. 92, n. 4, p. 459-466, 2001.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F. *et al.* **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** New England Journal of Medicine, v. 363, n. 8, p. 711-723, 2010.

HUBER-LANG, M.; LAMBRIS, J. D.; WARD P. A. **Innate immune responses to trauma.** Nature Immunology, v. 19, n. 4, p. 327-341, 2018.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M. *et al.* **Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, 2001.

JARMILA, V.; VAVRÍKOVÁ, E. **Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities – A review.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 17, n. 32, p. 3596-3607, 2011.

KEENAN, B. P.; JAFFEE, E. M. **Whole cell vaccines – Past progress and future strategies.** *Seminars in Oncology*, v. 39, n. 3, p. 276-286, 2012.

KHONG, H. T.; RESTIFO N. P. **Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes.** *Nature Immunology*, v. 3, n. 11, p. 999-1005, 2002.

KIM, T. H.; JIN, H.; KIM, H. W. *et al.* **Mannosylated chitosan nanoparticle-based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB/c mice bearing CT-26 carcinoma cells.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 7, p. 1723-1732, 2006.

KIRKWOOD, J. M.; BUTTERFIELD, L. H.; TARHINI, A. A. *et al.* **Immunotherapy of cancer in 2012.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 62, n. 5, p. 309-335, 2012.

KOEBEL, C. M.; VERMI, W.; SWANN, J. B. *et al.* **Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.** *Nature*, v. 450, n. 7171, p. 903–907, 2007.

KUMAR, M. N. V. R. **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

KUPPUSAMY, S.; KARUPPAIAH, J. **Antioxidant and cytotoxic efficacy of chitosan on bladder cancer.** *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 2, n. 2, p. 769-773, 2012.

LANCTÔT, S.; FUSTIER, P.; TAHERIAN, A. R. *et al.* **Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution.** *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 3, p. 2269-2281, 2017.

LIU, S. Y.; WEI, W.; YUE, H. *et al.* **Nanoparticles-based multi-adjuvant whole cell tumor vaccine for cancer immunotherapy.** *Biomaterials*, v. 34, n. 33, p. 8291-8300, 2013.

LIU, Y.; WANG, R.; HOU, J. *et al.* **Paclitaxel/chitosan nanosuspensions provide enhanced intravesical bladder cancer therapy with sustained and prolonged delivery of paclitaxel.** *ACS Applied Bio Materials*, v. 1, n. 6, p. 1992-2001, 2018.

LOSKOG, A.; NINALGA, C.; HEDLUND, T. *et al.* **Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy.** *Laboratory animals*, v. 39, n. 4, p. 384-393, 2005.

LUO, L.; LV, M.; ZHUANG, X. *et al.* **Irradiation increases the immunogenicity of lung cancer cells and irradiation-based tumor cell vaccine elicits tumor-specific T cell responses *in vivo*.** *OncoTargets and Therapy*, v. 12, p. 3805-3815, 2019.

LV, D.; HU, Z.; LU, L. *et al.* **Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery.** *Oncology Letters*, v. 14, n. 6, p. 6999-7010, 2017.

MARCINKIEWICZ, J.; POLEWSKA, A.; KNAPCZYK, J. **Immunoadjuvant properties of chitosan.** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 39, n. 1-2, p. 127-132, 1991.

MELERO, I.; HERVAS-STUBBS, S.; GLENNIE, M. *et al.* **Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy.** *Nature Reviews Cancer*, v. 7, n. 2, p. 95-106, 2007.

MELLMAN, I.; COUKOS, G.; DRANOFF, G. **Cancer immunotherapy comes of age.** *Nature*, v. 480, n. 7378, p. 480-489, 2011.

MOHAMED, E. A. **Copper and chitosan nanoparticles as potential elicitors of innate immune response in date palm: a comparative study.** *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 52, n. 17-18, p. 1276-1288, 2019.

MOUEZ, M. A.; ZAKI, N. M.; MANSOUR, S. *et al.* **Bioavailability enhancement of verapamil HCl via intranasal chitosan microspheres.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, p. 59-66, 2014.

NASCIMENTO, M. H. M. do; LOMBELLO, C. B. **Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso.** *Polímeros*, v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

NISHIMURA, K.; ISHIHARA, C.; UKEI, S. *et al.* **Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin.** *Vaccine*, v. 4, n. 3, p. 151-156, 1986.

NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S. I.; NISHI, N. *et al.* **Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea-pigs.** *Vaccine*, v. 3, n. 5, p. 379-384, 1985.

NISHIMURA, K.; NISHIMURA, S.; NISHI, N. *et al.* **Immunological activity of chitin and its derivatives.** *Vaccine*, v. 2, n. 1, p. 93-99, 1984.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. *et al.* **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OSUKA, A.; OGURA, H.; UEYAMA, M. *et al.* **Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune system homeostasis.** *Acute Medicine & Surgery*, v. 1, n. 2, p. 63-69, 2014.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. **Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines.** *Immunity*, v. 39, n. 1, p. 38-48, 2013.

RAMIREZ-MONTAGUT, T. *Cancer Vaccines.* In: SINGH, M.; SALNIKOVA, M. Editores. **Novel approaches and strategies for biologics, vaccines and cancer therapies.** 2ª edição. Cambridge: Elsevier, 2015. p. 365–388.

RANDAZZO, M.; TERNESS, P.; OPELZ, G. *et al.* **Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited.** *International Journal of Cancer*, v. 130, n. 10, p. 2219-2231, 2012.

RESLAN, L.; DALLE, S.; DUMONTET, C. **Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies.** *MAbs*, v. 1, n. 3, p. 222-229, 2009.

SALEHI, F.; BEHBOUDI, H.; KAVOOSI, G. *et al.* **Chitosan promotes ROS-mediated apoptosis and S phase cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells:**

Evidence for intercalative interaction with genomic DNA. RSC Advances, v. 7, n. 68, p. 43141-43150, 2017.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. **Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.** Science, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SHAKYA, A. K.; NANDAKUMAR, K. S. **Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases.** Journal of the Royal Society Interface, v. 10, n. 79, p. 20120536, 2013.

SHORE, N. D. **Advances in the understanding of cancer immunotherapy.** BJU International, v. 116, n. 3, p. 321-329, 2015.

SIMONS, J. W.; SACKS, N. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic cancer cellular immunotherapy: The GVAX (TM) vaccine for prostate cancer.** Urologic Oncology, v. 24, n. 5, p. 419-424, 2006.

SUN, Z.; REN, Z.; YANG, K. *et al.* **A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8+ T-cell response and effective tumor control.** Nature Communications, v. 10, n. 1, p. 3874, 2019.

SUZUKI, K.; OKAWA, Y.; HASHIMOTO K. **Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis.** Microbiology and Immunology, v. 28, n. 8, p. 903-912, 1984.

TALASAZ, A. H. H.; GHAHREMANKHANI, A. A.; MOGHADAM, S. H. *et al.* **In situ gel forming systems of poloxamer 407 and hydroxypropyl cellulose or hydroxypropyl methyl cellulose mixtures for controlled delivery of vancomycin.** Journal of Applied Polymer Science, v. 109, n. 4, p. 2369-2374, 2008.

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. **Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment.** Nature Reviews Cancer, v. 12, n. 4, p. 237-251, 2012.

YANG, X. H.; REN, L. S.; WANG, G. P. *et al.* **A new method of establishing orthotopic bladder transplantable tumor in mice.** Cancer Biology & Medicine, v. 9, n. 4, p. 261-265, 2012.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W. *et al.* **Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination.** *Vaccine*, v. 25, n. 11, p. 2085-2094, 2007.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. **The history and advances in cancer immunotherapy: Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications.** *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 8, p. 807-821, 2020.

ZHAO, L.; SETH, A.; WIBOWO, N. *et al.* **Nanoparticle vaccines.** *Vaccine*, v. 32, n. 3, p. 327-337, 2014.

6. CONCLUSÃO GERAL

Nosso trabalho demonstrou que a mortalina encontra-se superexpressa em tecidos vesicais tumorais de camundongos e que sua inibição reduz a viabilidade das células da linhagem MB49, promovendo o aumento nos índices de apoptose e necrose destas células. Após a submissão das células ao estresse oxidativo, a viabilidade celular reduziu ainda mais. Este trabalho também sugeriu um novo método de imunoterapia intravesical, utilizando células MB49 embebidas em matriz de TPG, que foi capaz de estimular uma resposta imune sistêmica antitumoral, afetando o desenvolvimento do carcinoma urotelial de bexiga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENOZA, P.; MANIVEL, C.; FRALEY, E. E. **Primary adenocarcinoma of urinary bladder clinicopathologic study of 16 cases**. *Urology*, v. 29, n. 1, p. 9-14, 1987.

ABOL-ENEIN, H.; KAVA, B. R.; CARMACK, A. J. K. **Nonurothelial cancer of the bladder**. *Urology*, v. 69, n. 1, p. 93-104, 2007.

ALEXANDER, S. F. **Medical report on the Bari Harbor mustard casualties**. *Military Surgeon*, v. 101, n. 1, p. 1-17, 1947.

AL-MAMARI, S. A.; AL-BUSAIDY, S. S. **Urological Cancer Management**. 1ª edição. Suíça: Springer, 2015, 325p.

ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. *et al.* **Bladder cancer incidence and mortality : A global overview and recent trends**. *European Urology*, v. 71, n. 1, p. 96-108, 2017.

AVRITSCHER, E. B. C. *et al.* **Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications**. *Urology*, v. 68, n. 3, p. 549-553, 2006.

BABJUK, M.; BURGER, M.; COMPÉRAT, E. M. *et al.* **European Association of Urology Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta T1 and CIS)**. Arnhem: EAU Guidelines Office, 2019, 50p.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. 2001. A. **Inflammation and cancer: Back to Virchow?**. *The Lancet*, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.

BIANCONI, E.; PIOVESAN, A.; FACCHIN, F. *et al.* **An estimation of the number of cells in the human body**. *Annals of Human Biology*, v. 40, n. 6, p. 463-471, 2013.

BOTTEMAN, M. F.; PASHOS, C. L.; REDAELLI, A. *et al.* **The health economics of bladder cancer: A comprehensive review of the published literature**. *Pharmacoeconomics*, v. 21, n. 18, p. 1315-1330, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **TNM: Classificação de Tumores Malignos**. 6ª edição. Rio de Janeiro: INCA, 2004, 254p.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. *et al.* **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 6, p. 394-424.

BROWN, F. M. **Urine cytology. It is still the gold standard for screening?**. Urologic Clinics of North America, v. 27, n.1, p. 25-37, 2000.

BURGER, M.; CATTO, J. W.; DALBAGNI, G. *et al.* **Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer**. European Urology, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013.

BURGUÉS, O.; FERRER, J.; NAVARRO, S. *et al.* **Hepatoid adenocarcinoma of the urinary bladder. An unusual neoplasm**. Virchows Archiv, v. 435, n. 1, p. 71-75, 1999.

CALDERWOOD, S. K.; KHALEQUE, M. A.; SAWYER, D. B. *et al.* **Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis**. Trends in Biochemical Sciences, v. 31, n. 3, p. 164-172, 2006.

CALMETTE, A.; GUERIN, C.; BOQUET, A. *et al.* **La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG"**. Paris: Masson et cie, 1927, 250p.

CHEN, F.; ZHANG, G.; CAO, Y. *et al.* **MB49 murine urothelial carcinoma: Molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin**. The Journal of Urology, v.182, n.6, p.2932-2937, 2009.

CHENG, H.; ZHU, J.; LI, S. *et al.* **An O₂ self-sufficient biomimetic nanoplatform for highly specific and efficient photodynamic therapy**. Advanced Functional Materials, v. 26, n. 43, p. 7847-7860, 2016.

CHEUNG, G.; SAHAI, A.; BILLIA, M. *et al.* **Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer**. BMC Medicine, v. 11, n. 13, p. 1-8, 2013.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. **Heat shock proteins in cancer : diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications.** Cell Stress and Chaperones, v. 10, n. 2, p. 86-103, 2005.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. **Inflammation and cancer.** Nature, v. 420, n. 7092, p. 860-867, 2002.

CUMBERBATCH, M. G.; COX, A.; TEARE, D. **Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer: A systematic review and meta-analysis.** JAMA Oncology, v. 1, n. 9, p. 1282-1290, 2015.

DADHANIA, V.; CZERNIAK, B.; GUO, C. C. **Adenocarcinoma of the urinary bladder.** American Journal of Clinical and Experimental Urology, v. 3, n. 2, p. 51-63, 2015.

DAHM, P.; GSCHWEND, J. E. **Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder: A review.** European Urology, v. 44, n. 6, p. 672-681, 2003.

DENOIX, P. F. **Tumor, node, and metastasis (TNM).** Bulletin de l'Institut National d'Hygiène, v. 1, p. 1-69, 1944.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W. *et al.* **Photodynamic therapy.** Journal of the National Cancer Institute, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

DRUMMOND, L. R.; GOMES, L. H. L. S.; CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. *et al.* **Expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) no músculo cardíaco em resposta ao treinamento físico: uma revisão sistemática.** Revista da Educação Física / UEM, v. 24, n. 4, p. 637-647, 2013.

DUCHEK, M.; JOHANSSON, R.; JAHNSON, S. *et al.* **Bacillus Calmette-Guerin is superior to a combination of epirubicin and interferon-alpha2b in the intravesical treatment of patients with stage T1 urinary bladder cancer. A prospective, randomized, Nordic study.** European Urology, v. 57, n. 1, p. 25-31, 2010.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. *et al.* **A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.** Pharmaceutical research, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

EBLE, J. N.; SAUTER, G.; EPSTEIN, J. I. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press, 2004. 354p.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C. *et al.* **AJCC cancer staging manual**. 7ª edição. New York: Springer, 2010. 648p.

EISSA, S. S.; EL-BOLKAINY, M. N.; EISSA, M. S. **Schistosomiasis and bladder cancer**. Schistosomiasis, IntechOpen, p.143-168, 2012.

EPSTEIN, J. I.; AMIN, M. B., REUTER, V. R. *et al.* **The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee**. The American Journal of Surgical Pathology, v. 22, n. 12, p. 1435-1448, 1998.

EPSTEIN, J. I.; AMIN, M. B.; REUTER, V. E. Glandular Lesions. *In*: Epstein, J.; *et al.* Editores. **Biopsy interpretation of the bladder**. 2ª edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p. 180-213.

FAYSAL, M. H. **Squamous cell carcinoma of the bladder**. The Journal of Urology. v.126, n. 5, p. 598-599, 1981.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. *et al.* **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. International Journal of Cancer, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GREINER, T. **Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45, n. 4, p. 388-398, 2012.

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. **Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression**. Genes & Development, v. 32, n. 19-20, p. 1267-1284, 2018.

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. **Measuring cancer evolution from the genome**. The Journal of Pathology, v. 241, n. 2, p. 183-191, 2016.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. **Clonal evolution in cancer**. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012.

GRIGNON, D. J. Neoplasms of the urinary bladder. *In*: BOSTWICK, D. G.; EBLE, J. N. Editores. **Urologic surgical pathology**. 1ª edição. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1997, p. 216-305.

GRIMM, M. O.; STEINHOFF, C.; SIMON, X. *et al.* **Effect of routine repeat transurethral resection for superficial bladder cancer: A long-term observational study**. *The Journal of Urology*, v. 170, n. 2, p. 433-437, 2003.

HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V. G.; BARTEK, J. **An oncogene-induced DNA damage model for cancer development**. *Science*, v. 319, n. 5868, p. 1352-1355, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAUSMAN, D. M. **What is cancer?**. *Perspectives in Biology and Medicine*, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019.

HERR, H. W. **The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors**. *The Journal of Urology*, v. 162, n. 1, p. 74-76, 1999.

HUMPHREY, P. A.; MOCH, H.; CUBILLA, A. L. *et al.* **The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs – Part B: Prostate and bladder tumours**. *European Urology*, v. 70, n. 1, p. 106-119, 2016.

ISCHIA, J.; SO, A. I. **The role of heat shock proteins in bladder cancer**. *Nature Reviews Urology*, v. 10, n. 7, p. 386-395, 2013.

ISMAIL, Y. M.; KAMAL, A.; YOUSOF, O. *et al.* **Primary bladder adenocarcinoma: A five-year retrospective clinicopathologic study of 42 cases in egyptian NCI (2010-14)**. *Journal of Cancer Therapy*, v. 10, p. 97-116, 2019.

JARVINEN, R.; KAASINEN, E.; SANKILA, A. *et al.* **Long-term efficacy of maintenance bacillus Calmette-Guerin versus maintenance mitomycin C instillation therapy in frequently recurrent TaT1 tumours without carcinoma *in***

situ: A subgroup analysis of the prospective, randomised FinnBladder I study with a 20-year follow-up. *European Urology*, v. 56, n. 2, p. 260-265, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 338p.

KARIN, M. **Nuclear factor- κ B in cancer development and progression.** *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 431-436, 2006.

KAWAI, K.; MIYAZAKI, J.; JORAKU, A. *et al.* **Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine.** *Cancer Science*, v. 104, n. 1, p. 22-27, 2013.

KHONG, H. T.; RESTIFO N. P. **Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes.** *Nature Immunology*, v. 3, n. 11, p. 999-1005, 2002.

KIM, S. P.; FRANK, I.; CHEVILLE, J. C. *et al.* **The impact of squamous and glandular differentiation on survival after radical cystectomy for urothelial carcinoma.** *The Journal of Urology*, v. 188, n. 2, p. 405-409, 2012.

KIRKALI, Z.; CHAN, T.; MANOHARAN, M. *et al.* **Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis.** *Urology*, v. 66, n. 6, p. 4-34, 2005.

KITAMURA, H.; TSUKAMOTO, T.; SHIBATA, T. *et al.* **Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin, vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0209.** *Annals of Oncology*, v. 25, n. 6, p. 1192-1198, 2014.

KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. **Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity.** *Nature Reviews Cancer*, v. 15, n. 1, p. 25-41, 2015.

KRIEGMAIR, M.; ZAAK, D.; KNUECHEL, R. *et al.* **Photodynamic cystoscopy for detection of bladder tumors.** *Seminars in Laparoscopic Surgery*, v. 6, n. 2, p. 100-103, 1999.

LEIBOVITCH, I.; BEN-CHAIM, J.; RAMON, J. *et al.* **The significance of ureteral obstruction in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder.** *Journal of Surgical Oncology*, v. 52, n. 1, p. 31-35, 1993.

LETASIOVÁ, S.; MEDVE'OVÁ, A.; ŠOVČÍKOVÁ, A. *et al.* **Bladder cancer, a review of the environmental risk factors.** *Environmental Health*, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2012.

LIN, T.; ZHAO, X.; ZHAO, S. *et al.* **O₂-generating MnO₂ nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bladder cancer by ameliorating hypoxia.** *Theranostics*, v. 8, n. 4, p. 990-1004, 2018.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L. *et al.* Tumor Cells and the Onset of Cancer. *In: Freeman, W. H. Editor. Molecular cell biology.* 5^a edição. New York: WH Freeman and Company; 2003. p. 936-943.

LOPEZ-BELTRAN, A.; HENRIQUES, V.; MONTIRONI, R. *et al.* Infiltrating urothelial carcinoma. *In: EBLE, J. N.; et al. Editores. World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs.* Lyon: IARC Press; 2004. p. 93-109.

LOPEZ-BELTRAN, A.; HENRIQUES, V.; MONTIRONI, R. *et al.* **Variants and new entities of bladder cancer.** *Histopathology*, v. 74, n. 1, p. 77-96, 2019.

MA, Z.; IZUMI, H.; KANAI, M. *et al.* **Mortalin controls centrosome duplication via modulating centrosomal localization of p53.** *Oncogene*, v.25, n. 39, p.5377-5390, 2006.

MADEB, R.; MESSING, E. M. **Gender, racial and age differences in bladder cancer incidence and mortality.** *Urologic Oncology*, v. 22, n. 2, p. 86-92, 2004.

MALMSTRÖM, P. U.; SYLVESTER, R. J.; CRAWFORD, D. E. *et al.* **An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer.** *European Urology*, v. 56, n. 2, p. 247-256, 2009.

MERLO, L. M. F.; PEPPER, J. W.; REID, B. J. *et al.* **Cancer as an evolutionary and ecological process.** *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 12, p. 924-935, 2006.

MESSING, E. M.; VAILLANCOURT, A. **Hematuria screening for bladder cancer.** Journal of Occupational and Environmental Medicine, v. 32, n. 9, p. 838-845, 1990.

MITRA, A. P.; COTE, R. J. **Molecular screening for bladder cancer: progress and potential.** Nature Reviews Urology, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2010.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. **Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors.** The Journal of Urology, v. 116, n. 2, p. 180-183, 1976.

MOSTAFID, A. H.; PALOU REDORTA, J.; SYLVESTER, R. *et al.* **Therapeutic options in highrisk non-muscle-invasive bladder cancer during the current worldwide shortage of bacille Calmette-Guérin.** European Urology, v. 67, n. 3, p. 359-360, 2015.

MURPHY, W. M.; GRIGNON, D. J.; PERLMAN, E. J. **Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures.** Washington: American Registry of Pathology, 2004, 394p.

NOVOTNY, V.; HAKENBERG, O. W.; WIESSNER, D. *et al.* **Perioperative complications of radical cystectomy in a contemporary series.** European Urology, v. 51, n. 2, p. 397-402, 2007.

PEARL, R. **Cancer and tuberculosis***. American Journal of Epidemiology, v. 9, n. 1, p. 97-159, 1929.

PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. **Inflammation as a tumor promoter in cancer induction.** Seminars in Cancer Biology, v. 14, n. 6, p. 433-439, 2004.

PRASAD, S. M.; DECASTRO, G. J.; STEINBERG, G. D. **Urothelial carcinoma of the bladder: Definition, treatment and future efforts.** Nature Reviews Urology, v. 8, n. 11, p. 631–642, 2011.

RAMIREZ-MONTAGUT, T. Cancer Vaccines. *In*: SINGH, M.; SALNIKOVA, M. Editores. **Novel approaches and strategies for biologics, vaccines and cancer therapies.** 2ª edição. Cambridge: Elsevier, 2015. p. 365–388.

REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M. S.; BOCHNER, B. H. **The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – A current perspective.** *Nature Reviews Urology*, v. 11, n. 3, p. 153-162, 2014.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. **Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode.** *Nature*, v. 205, p. 698-699, 1965.

ROTHMAN, N.; GARCIA-CLOSAS, M.; CHATTERJEE, N. *et al.* **A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci.** *Nature Genetics*, v. 42, n. 11, p. 978-984, 2010.

RUNDLE, J. S. H.; HART, A. J.; MCGEORGE, A. *et al.* **Squamous cell carcinoma of bladder. A review of 114 patients.** *British Journal of Urology*, v. 54, n. 5, p. 522-526, 1982.

SCHMIDT-HANSEN, M.; BERENDSE, S.; HAMILTON, W. **The association between symptoms and bladder or renal tract cancer in primary care: A systematic review.** *British Journal of General Practice*, v. 65, n. 640, p. 769-775, 2015.

SHARIAT, S. F.; MILOWSKY, M.; DROLLER, M. J. **Bladder cancer in the elderly.** *Urologic Oncology*, v. 27, n. 6, p. 653-667, 2009.

SHELLEY, M. D.; JONES, G.; CLEVES, A. *et al.* **Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): A systematic review.** *BJU International*, v. 109, n. 4, p. 496-505, 2012.

SHERR, C. J. **Cancer cell cycles.** *Science*, v.274, n. 5293, p.1672-1677, 1996.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2017.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 67, p. 7-30, 2017.

SIVASUBRAMANIAN, M.; CHUANG, Y. C.; LO, L. W. **Evolution of nanoparticle-mediated photodynamic therapy: From superficial to deep-seated cancers.** *Molecules*, v. 24, n. 3, p.520, 2019.

STENZL, A.; COWAN, N. C.; DE SANTIS, M. *et al.* **The updated EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer.** *European Urology*, v. 55, n. 4, p. 815-825, 2009.

STERN, M. C.; LIN, J.; FIGUEROA, J. D. *et al.* **Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: Findings from the international consortium of bladder cancer.** *Cancer Research*, v. 69, n. 17, p. 6857-6864, 2009.

STERNBERG, C. N.; YAGODA, A.; SCHER, H. I. *et al.* **Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium.** *The Journal of Urology*, v. 133, n. 3, p. 403-407, 1985.

SUMMERHAYES, I. C.; FRANKS, L. M. **Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium *in vitro*.** *Journal of the National Cancer Institute*, v. 62, n. 4, p. 1017-1023, 1979.

SVATEK, R. S.; HOLLENBECK, B. K.; HOLMÄNG, S. *et al.* **The economics of bladder cancer: Costs and considerations of caring for this disease.** *European Urology*, v. 66, n. 2, p. 253-262, 2014.

SYLVESTER, R. J.; BRAUSI, M. A.; KIRKELS, W. J. *et al.* **Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin, and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid in patients with intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder.** *European Urology*, v. 57, n. 5, p. 766-773, 2010.

SYLVESTER, R. J.; OOSTERLINCK, W.; HOLMANG, S. *et al.* **Systematic review and individual patient data meta-analysis of randomized trials comparing a single immediate instillation of chemotherapy after transurethral resection with transurethral resection alone in patients with stage pTa-pT1 urothelial carcinoma of the bladder: Which patients benefit from the instillation?** *European Urology*, v. 69, n. 2, p. 231-244, 2016.

VAN DEN BOSCH, S.; WITJES, J. A. **Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: A systematic review.** *V. 60*, n. 3, p. 493-500, 2011.

VAN OSCH, F. H.; JOCHEMS, S. H.; VAN SCHOOTEN, F. J. *et al.* **Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: A meta-analysis of 89 observational studies.** *International Journal of Epidemiology*, v. 45, n. 3, p. 857-870, 2016.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. **Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation.** *Science*, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VERMA, S.; RAJESH, A.; PRASAD, S. R. *et al.* **Urinary bladder cancer: Role of MR imaging.** *Radiographics*, v. 32, n. 2, p. 371-387, 2012.

VISHNU, P.; MATHEW, J.; TAN, W. **Current therapeutic strategies for invasive and metastatic bladder cancer.** *OncoTargets and Therapy*, v. 2011, n. 4, p. 97-113, 2011.

WADHWA, R.; TAKANO, S.; ROBERT, M. *et al.* **Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 45, p. 29586-29591, 1998.

WANG, J. J.; LEI, K. F.; HAN, F. **Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 12, p. 3855-3864, 2018.

WEN, X.; LI, Y.; HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 19, p. 140-152, 2017.

WHITMORE, W. F.; MARSHALL, V. F. **Radical Total cystectomy for cancer of the bladder: 230 consecutive cases five years later.** *The Journal of Urology*, v. 87, p. 853-868, 1962.

WITJES, J. A. **Management of BCG failures in superficial bladder cancer: A review.** *European Urology*, v. 49, n. 5, p. 790-797, 2006.

WITJES, J. A.; BRUINS, H. M.; CATHOMAS, R. *et al.* **European Association of Urology Guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer.** Arnhem: EAU Guidelines Office, 2019, 82p.

YEUNG, C.; DINH, T.; LEE, J. **The health economics of bladder cancer: An updated review of the published literature**. *Pharmacoeconomics*, v. 32, n. 11, p. 1093-1104, 2014.

YOUSSEF, R.; KAPUR, P.; KABBANI, W. *et al.* **Bilharzial vs non-bilharzial related bladder cancer: Pathological characteristics and value of cyclooxygenase-2 expression**. *BJU International*, v. 108, n. 1, p. 31-37, 2010.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W. *et al.* **Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination**. *Vaccine*, v. 25, n. 11, p. 2085-2094, 2007.

ZHANG Y. **Understanding the gender disparity in bladder cancer risk: The impact of sex hormones and liver on bladder susceptibility to carcinogens**. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, v. 31, n. 4, p.287-304, 2013.

ZHANG, N.; LI, D.; SHAO, J. *et al.* **Animal models for bladder cancer: The model establishment and evaluation (review)**. *Oncology Letters*, v. 9, n. 4, p. 1515-1519, 2015.

ZHAO, C.; LI, Y.; SHAO, L. *et al.* **Reactive oxygen species-responsive theranostic nanoparticles for enhanced hypoxic tumor photodynamic therapy via synchronous HIF-1 α inhibition and ATP depletion**. *Materials Chemistry Frontiers*, v. 3, p. 1793-1799, 2019.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EXPRESSÃO PROTEICA DA HSP MITOCONDRIAL HSPA9 EM MODELO ORTOTÓPICO DE CÂNCER UROTELIAL DE BEXIGA", protocolada sob o CEUA nº 3466140717 (ID 000676), sob a responsabilidade de **Jhonne Pedro Pedott Santana e equipe; Ricardo Carneiro Borra** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 17/08/2017.

We certify that the proposal "PROTEIN EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL HSP, HSPA9, IN ORTHOTOPIC BLADDER UROTHELIAL CANCER MODEL", utilizing 15 Isogenics mice (15 females), protocol number CEUA 3466140717 (ID 000676), under the responsibility of **Jhonne Pedro Pedott Santana and team; Ricardo Carneiro Borra** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/17/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [08/2018](#)

Área: [Centro de Ciências Biológicas E da Saúde](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 7 semanas](#)

N: [15](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 24 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

São Carlos, 25 de maio de 2020

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Padronização do Modelo de Carcinoma Urotelial de Bexiga Induzido com Células MB49 e Gel Termorreversível em Camundongos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 9234221018 (ID 001061), sob a responsabilidade de **Ricardo Carneiro Borra e equipe; Jhonne Pedro Pedott Santana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 26/11/2018.

We certify that the proposal "Standardization of Urothelial Bladder Carcinoma Model Induced with MB49 Cells and Thermoreversible Gel in C57BL/6 Mice", utilizing 50 Isogenics mice (50 females), protocol number CEUA 9234221018 (ID 001061), under the responsibility of **Ricardo Carneiro Borra and team; Jhonne Pedro Pedott Santana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 11/26/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [11/2018](#) a [02/2019](#)

Área: [Genética E Evolução](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [50](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 24 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

São Carlos, 25 de maio de 2020

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFICÁCIA DA INSTILAÇÃO DE CÉLULAS MB49 E GEL TERMORREVERSÍVEL NA IMUNIZAÇÃO CONTRA O CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA", protocolada sob o CEUA nº 4556170619 (ID 001262), sob a responsabilidade de **Ricardo Carneiro Borra** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/07/2019.

We certify that the proposal "EFFECTIVENESS OF THE INSTILLATION OF MB49 CELL AND THERMORREVERSIBLE GEL IN IMMUNIZATION AGAINST BLADDER UROTELIAL CARCINOMA", utilizing 54 Isogenics mice (54 females), protocol number CEUA 4556170619 (ID 001262), under the responsibility of **Ricardo Carneiro Borra** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/18/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **01/2020**

Área: **Genética E Evolução**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **54**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **18 a 22 g**

Local do experimento: Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

São Carlos, 25 de maio de 2020

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos