

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

Pablo Gil Mortol Trevisoli

**Comparação da capacidade de formulações medicamentosas de diferentes
quimioterápicos em induzir morte celular em células da linhagem MB49 de
tumor de bexiga murino**

SÃO CARLOS

2018

Pablo Gil Mortol Trevisoli

Comparação da capacidade de formulações medicamentosas de diferentes quimioterápicos em induzir morte celular em células da linhagem MB49 de tumor de bexiga murino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

SÃO CARLOS

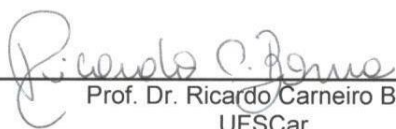
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde²
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

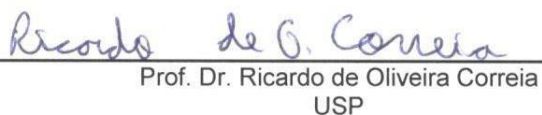
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Pablo Gil Mortol Trevisoli, realizada em 29/03/2018:



Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra
UFSCar



Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar



Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Correia
USP

BANCA EXAMINADORA**PRESIDENTE DA BANCA****Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra**

Professor Adjunto do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

TITULARES**Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira**

Professor Adjunto do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

Dr. Ricardo de Oliveira Correia

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos
PPG-Biotec-UFSCar.

SUPLENTE**Prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur**

Professora Adjunta do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

Dr. Ivan Nascimento

Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo – USP
Pesquisador do Instituto Butantan.

“Não há nada que seja maior evidência de insanidade do que fazer a mesma coisa dia após dia e esperar resultados diferentes.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Não trilhei esta jornada sozinho, por isso gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente.

Agradeço:

À Isabela, o grande amor da minha vida, por estar presente em todos os momentos nesses últimos 10 anos, pelo amor, carinho e dedicação.

E não menos importante, aos meus pais por sempre me apoiarem de todas as formas possíveis, de fazerem de meus sonhos seus próprios, por quem tenho enorme amor, gratidão e admiração.

À minha irmã Pamella por fazer parte de minha vida e proporcionar momentos inesquecíveis, a quem amo e sei que posso contar sempre.

Ao meu irmão Jhonathan, *in memoriam*, que apesar de ter nos deixado muito cedo, me deixou muitos aprendizados e possui uma grande responsabilidade pelo que sou hoje.

Ao meu cunhado Júnior, que sempre me tratou como um irmão e assim o tenho.

À minha sogra Wania e ao meu sogro Manuel por permitirem e apoiarem que a Isabela embarcasse comigo nesta jornada.

Ao Jonas, Roberta, Jaque e Ricardo, amigos que fiz durante a graduação e que se tornaram grandes pilares em minha vida até hoje.

Ao Prof. Carlão, *in memoriam*, pela amizade, pelo respeito, por todos os conselhos e por quem tenho muitas saudades.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ricardo Borra, por toda a dedicação, ensinamentos e orientação, não somente no que diz respeito à ciência, mas também à vida; por quem tenho um enorme respeito e carinho e a quem tenho como um irmão mais velho.

À Dra. Ana Carolina Pagliarone que foi como uma coorientadora no início de meu projeto, com quem aprendi muito e por quem tenho muito respeito.

Aos meus amigos de laboratório, Bia, Isabela, Mariana, Thaianne, Léo, Naiara, David, Jhonne e Joelson, todos de alguma forma contribuíram para minha evolução.

Preciso agradecer novamente a três pessoas, a minha namorada Isabela e aos meus amigos Jhonne e Joelson, que foram fundamentais durante a dissertação e que me forneceram todo o suporte possível.

Ao Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, ao Dr. Ricardo de Oliveira Correia, à Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur e ao Dr. Ivan Nascimento, por terem aceitado fazer parte de minha banca de defesa e por todos os conselhos e ensinamentos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Citotoxicidade da cisplatina em relação às diferentes concentrações.....	23
Figura 2. Citotoxicidade da cisplatina em relação ao tempo de exposição.....	24
Figura 3. Citotoxicidade da cisplatina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico	24
Figura 4. Citotoxicidade da cisplatina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico	25
Figura 5. Citotoxicidade da daunorrubicina em relação às diferentes concentrações.....	26
Figura 6. Citotoxicidade da daunorrubicina em relação ao tempo de exposição.....	27
Figura 7. Citotoxicidade da daunorrubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico.....	27
Figura 8. Citotoxicidade da daunorrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico	28
Figura 9. Citotoxicidade da doxorrubicina em relação às diferentes concentrações.....	29
Figura 10. Citotoxicidade da doxorrubicina em relação ao tempo de exposição.....	30
Figura 11. Citotoxicidade da doxorrubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico.....	30
Figura 12. Citotoxicidade da doxorrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico	31
Figura 13. Citotoxicidade da epirrubicina em relação às diferentes concentrações	32
Figura 14. Citotoxicidade da epirrubicina em relação ao tempo de exposição.....	32
Figura 15. Citotoxicidade da epirrubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico.....	33
Figura 16. Citotoxicidade da epirrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico	34
Figura 17. Citotoxicidade da mitoxantrona em relação às diferentes concentrações	34
Figura 18. Citotoxicidade da mitoxantrona em relação ao tempo de exposição	35

Figura 19. Citotoxicidade da mitoxantrona em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico.....	36
Figura 20. Citotoxicidade da mitoxantrona em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico	36
Figura 21. Viabilidade celular após as 24h subsequentes à retirada dos quimioterápicos .	38
Figura 22. Controle positivo de apoptose	39
Figura 23. Curva de discriminação de morte das células MB49 após tratamento com cisplatina.....	40
Figura 24. Curva de discriminação de morte das células MB49.....	41
Tabela 1. Dados dos quimioterápicos utilizados	18
Tabela 2. Concentrações usadas para o ensaio de viabilidade.....	19
Tabela 3. Concentrações usadas para o ensaio de discriminação de morte celular	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Associação Médica Brasileira
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno profissional)
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
CARL	Calreticulina
CB	Câncer de bexiga
CCE	Carcinoma de células escamosas
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CPT	Cisplatina
CTL	Controle
CUB	Câncerurotelial de bexiga
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a danos)
DAU	Daunorrubicina
DC	Dendritic cell(Célula dendrítica)
DMBA	Dimetilbenz(a)antraceno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DOX	Doxorrubicina
DP	Desvio Padrão
EPI	Epirubicina
EUA	Estados Unidos da América
FDP	<i>Fibrin degradation product</i> (Produto de degradação da fibrina)
HMGB1	Proteína B1 de grupo de alta mobilidade

HSP	Heatshockprotein (Proteína de choque térmico)
ICD	Immunogenic cell death (Morte celular imunogênica)
IFN-α	Interferon- <i>alfa</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MTX	Mitoxantrona
NAT2	N-acetiltransferase 2
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer - EUA)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRR	Pattern recognition receptor (Receptor de reconhecimento de padrões)
RAGE	Receptor for advanced glycation end products (Receptor específico do produto final da glicosilação)
RTU	Ressecção transuretral
SBP	Sociedade Brasileira de Patologia
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
TLR4	Toll-like receptor 4 (Receptor 4 do tipo Toll-like)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de Bexiga	1
1.1.1 Aspectos Gerais	1
1.1.2 Classificação	3
1.1.3 Sinais e Sintomas.....	4
1.1.4 Diagnósticos	4
1.1.5 Tratamentos	6
1.2 Modelo Experimental com Células MB49.....	7
1.3 Sistema Imune e o Câncer	7
1.4 Morte Celular Imunogênica	9
1.4 Caracterização dos Quimioterápicos	12
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Cultura de Células Tumorais.....	18
4.2 Viabilidade da Cultura de Células MB49 com Quimioterápicos.....	18

4.3	Discriminação e Detecção de Morte Celular <i>in vitro</i>	20
4.4	Análise Estatística	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1	Efeito dos Quimioterápicos na Viabilidade das Células MB49	22
5.1.1	Citotoxicidade da Cisplatina	22
5.1.2	Citotoxicidade da Daunorrubicina.....	25
5.1.3	Citotoxicidade da Doxorrubicina	28
5.1.4	Citotoxicidade da Epirubicina	31
5.1.5	Citotoxicidade da Mitoxantrona	34
5.1.6	Viabilidade e Ciclo Celular.....	37
5.1.7	Viabilidade Após a Remoção dos Tratamentos.....	37
5.2	Discriminação de Morte Celular das Células MB49 <i>in vitro</i>	39
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

RESUMO

COMPARAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMULAÇÕES MEDICAMENTOSAS DE DIFERENTES QUIMIOTERÁPICOS EM INDUZIR MORTE CELULAR EM CÉLULAS DA LINHAGEM MB49 DE TUMOR DE BEXIGA MURINO

Apesar dos recentes avanços nas áreas de prevenção e tratamento do câncer, o carcinoma urotelial de bexiga continua sendo um dos tipos mais comuns de neoplasias malignas no mundo, com índices de mortalidade de 20% dos casos. As células e moléculas do sistema imunológico são componentes fundamentais do microambiente tumoral. Provavelmente o fato de a célula neoplásica compartilhar antígenos com as células normais, de possuir alta taxa de crescimento e sofrer edição contribuem para a sua resistência em relação à resposta imunológica antitumoral. Mesmo com estes contratempos, a resposta imunológica continua sendo uma das melhores apostas no tratamento das neoplasias malignas. No passado, a morte celular homeostática, que muitas vezes ocorre por meio de apoptose, foi irrelevante para a resposta imune antitumoral uma vez que era incapaz de estimular o sistema imunológico. Porém, nos últimos anos, foi observado que certos tipos de apoptoses eram capazes de induzir resposta imune contra antígenos de células mortas, em particular quando elas eram derivadas de neoplasias malignas. Este tipo de fenômeno foi denominado de morte celular imunogênica (ICD). Apesar dos avanços na descoberta dos mecanismos envolvidos na morte celular associado às várias linhagens tumorais, nenhum trabalho até o presente momento avaliou sua eficácia em modelo de câncer de bexiga induzida pelos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento dessa doença. Sendo assim, o presente trabalho procurou avaliar a ação dos quimioterápicos cisplatina, mitoxantrona, daunorrubicina, doxorrubicina e epirubicina na viabilidade das células de linhagem MB49 e identificando a melhor dose com atividade apoptótica da cisplatina, mitoxantrona, daunorrubicina e doxorrubicina. Os resultados mostraram que os quimioterápicos em sua formulação farmacêutica apresentaram um bom desempenho contra as células MB49 *in vitro* e a cisplatina e a mitoxantrona mostraram-se eficientes em produzir apoptose, porém somente os testes *in vivo* poderão confirmar seu efeito imunogênico sobre essas células. Além disso, este trabalho mostrou que os efeitos da viabilidade podem ser bastante divergentes dependendo da dose e do tempo avaliados e a necessidade de um acompanhamento da viabilidade após a remoção dos tratamentos. Deste modo, conclui-se que as formulações medicamentosas da daunorrubicina, epirubicina, doxorrubicina e da mitoxantrona produziram graus variados de morte apoptótica *in vitro*, dependente do tempo de exposição e da concentração dos medicamentos.

Descritores: Câncer de Bexiga, Apoptose, Cisplatina, Mitoxantrona, Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirubicina.

ABSTRACT

CAPACITY COMPARISON OF DRUG FORMULATIONS OF DIFFERENT CHEMOTHERAPEUTICS IN INDUCING CELL DEATH IN MB49 CELLS OF MURINE BLADDER TUMOR

Despite recent advances in cancer prevention and treatment, bladder urothelial carcinoma continues to be one of the most common types of malignant neoplasms in the world, with a 20% mortality rate. The cells and molecules of the immune system are fundamental components of the tumor microenvironment. Probably the fact that the neoplastic cell shares antigens with normal cells, have high growth rate and suffer edition, contributes to its resistance to the antitumor immune response. Even with these obstacles, the immune response remains one of the best bets in the malignant neoplasms treatment. In the past, homeostatic cell death, which often occurs through apoptosis, was irrelevant to the antitumor immune response since it was unable to stimulate the immune system. However, in recent years, it has been observed that certain types of apoptosis were able to induce immune response against dead cell antigens, particularly when they were derived from malignant neoplasms. This type of phenomenon was called immunogenic cell death (ICD). Despite advances in the discovery of the mechanisms involved in cell death associated with various tumor lines, no work to date has evaluated its efficacy in the model of bladder cancer induced by chemotherapeutics commonly used in the treatment of this disease. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the action of cisplatin, mitoxantrone, daunorubicin, doxorubicin and epirubicin on the viability of MB49 lineage cells and to identify the best dose with apoptotic activity of cisplatin, mitoxantrone, daunorubicin and doxorubicin. The results showed that chemotherapeutics agents, in their pharmaceutical formulation, performed well against MB49 cells *in vitro*. Cisplatin and mitoxantrone proved to be efficient in producing apoptosis, but only *in vivo* tests could confirm their immunogenic effect on these cells. In addition, this work showed that the effects of viability may be quite divergent depending on the dose and time evaluated and the need for a follow-up of viability after treatment withdrawal. In addition, this work showed that the effects of viability might be quite divergent depending on the dose and time evaluated and the need to observe viability after treatment withdrawal. It is concluded that the drug formulations of daunorubicin, epirubicin, doxorubicin and mitoxantrone produced varying degrees of apoptotic death *in vitro*, depending on exposure time and drug concentration.

Key words: Bladder Cancer, Apoptosis, Cisplatin, Mitoxantrone, Daunorubicin, Doxorubicin, Epirubicin.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE BEXIGA

1.1.1. ASPECTOS GERAIS

Câncer é o nome dado a uma modalidade de mais de 200 doenças distintas com multiplicidade de causas (FERRARI; HERZBERG, 1997) cuja marca é a proliferação descontrolada das células do corpo que tipicamente adquiriram alterações em genes que regulam o ciclo celular ou controlam a apoptose das células com alterações significativas do genoma (SHERR, 1996), e que propicia a difusão e a invasão dos tecidos e órgãos em diversas regiões do corpo levando ao processo conhecido como metástases (FERRARI; HERZBERG, 1997). Dentre a ampla diversidade de neoplasias malignas que acometem o homem, as que se originam na bexiga são consideradas altamente impactantes em função da sua prevalência e dos índices de morbidade e mortalidade.

Apesar dos recentes avanços nas áreas de prevenção e tratamento, o câncer de bexiga (CB) continua sendo um dos tipos mais comuns de neoplasias malignas no mundo, principalmente nos países mais desenvolvidos. No ranking mundial de neoplasias malignas que acometem a população, o CB ocupa a 4ª posição para homens e a 9ª posição para mulheres (SIEVERT *et al.*, 2009; BURGER *et al.*, 2013).

Levantamentos mundiais mostraram que 429.000 pessoas foram acometidas com CB em 2012 e esta é a nona causa mais comum de câncer para ambos os sexos em todo mundo. Esta doença acomete preferencialmente os homens em relação às mulheres na proporção de 3:1 (FERLAY *et al.*, 2015), tendo em 2014 uma estimativa de mortalidade de 20% dos casos (SIEGEL *et al.*, 2014). No mesmo ano, no Brasil, o CB foi considerado entre os dez tipos de câncer mais incidentes entre os homens (INCA, 2014).

Estima-se que em 2016, no Brasil, surgiram 7.200 novos casos de CB em homens e 2.470 casos em mulheres, correspondendo a uma incidência de 7,26 casos a cada 100.000 homens e 2,39 a cada 100.000 mulheres (INCA, 2015).

O risco de desenvolvimento desta doença está associado principalmente ao avanço da idade (indivíduos acima dos 60 anos) e ao estilo de vida. A exposição a agentes tóxicos, como o arsênico, aminas aromáticas e principalmente o vício do tabagismo constituem os fatores de riscos relevantes (SHARIAT; MILOWSKY; DROLLER, 2009; LETASIOVÁ *et al.*, 2012).

Existe também uma forte correlação entre fatores genéticos e o desenvolvimento da doença. Parentes em primeiro grau de pacientes com CB têm o dobro do risco de desenvolver esse tipo de neoplasia. Os fatores genéticos hereditários não levam diretamente ao desenvolvimento da doença, mas conferem risco adicional à exposição de substâncias cancerígenas. Além disso, estudos genômicos têm encontrado algumas variantes genéticas que podem estar associadas ao aumento do risco de desenvolver CB, como é o caso da enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) que desempenha um papel chave na desintoxicação das aminas aromáticas e no metabolismo de drogas à base de nitrogênio e produtos químicos exógenos. Esses estudos mostraram uma forte associação com o aumento do risco de CB para os fenótipos de acetilação lenta NAT2, quando comparado aos fenótipos rápidos, principalmente entre os fumantes (WU, 2016).

A maioria dos tumores de bexiga está associada à exposição a agentes carcinogênicos cuja prevenção à exposição, poderia diminuir significativamente a incidência da doença. Entre os fatores externos mais importantes, o tabagismo ocupa a primeira posição. A sua presença está implicada em cerca de 50% dos casos. Os fumantes de cigarro têm risco de duas a quatro vezes mais chances de desenvolver CB em comparação com não fumantes e o risco aumenta com a intensidade e duração do tabagismo. Ao encerrar com o vício em tabaco, os riscos diminuem em 30% após 1-4 anos e 60% após 25 anos, mas nunca retornam ao nível equivalente ao dos não fumantes (GONZALEZ, 2015; KNOWLES; HURST, 2015).

As taxas de incidência atuais de CB refletem o consumo do tabagismo há mais de 20-30 anos atrás. De acordo com ANTONI *et al.*, (2017), as taxas atuais muito altas de incidência de CB entre homens espanhóis e americanos, provavelmente são consequência da alta prevalência de tabagismo nesses países nas décadas de 1970 e 1980.

O segundo fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CB é a exposição ocupacional a aminas aromáticas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e hidrocarbonetos clorados, representando 10% de todos os casos e que ocorre principalmente em indústrias que processam tintas, metais e produtos petrolíferos.

Um risco aumentado foi sugerido em usuários permanentes de tinturas capilares com o fenótipo de acetilação lenta NAT2, além disso, a exposição a radiações ionizantes, o uso de quimioterápicos como ciclofosfamida e a infecção por *Schistosoma haematobium*, um trematódeo parasita de aparelho urinário, endêmico de algumas regiões com Oriente Médio e partes da África, contribuem para aumentar o risco de desenvolvimento de CB (GONZALEZ, 2015; KNOWLES; HURST, 2015).

1.1.2. CLASSIFICAÇÃO

Existem múltiplas formas de câncer de bexiga e a mais comum é o carcinoma urotelial de bexiga (CUB), que representa mais de 90% de todos os cânceres da bexiga sendo, portanto, o mais estudado (CHOU; DANA, 2010; BURGER *et al.*, 2013). A segunda forma mais comum é o carcinoma de células escamosas (CCE) com taxa de incidência de cerca de 3 a 5%, sendo a infecção por *Schistosoma haematobium* o seu principal agente etiológico; sendo que nas regiões onde esse parasita é endêmico, a taxa de incidência chega a 30%. Outro fator associado ao desenvolvimento da neoplasia é a irritação crônica da bexiga, como o caso de pacientes com lesão medular dependentes de cauterização para a drenagem da bexiga. A terceira forma mais prevalente corresponde ao adenocarcinoma, e cuja incidência é menor do que os 2%. De forma similar ao CCE, o adenocarcinoma comumente ocorre em países onde a infecção pelo *Schistosoma haematobium* é endêmica (DAHM; GSCHWEND, 2003; CHOU; DANA, 2010).

Em relação às classificações, as neoplasias são organizadas histologicamente, por graus e por estágios de acordo com os critérios propostos pela OMS 2004 (EBLE *et al.*, 2004). No caso dos CUBs, a maioria dos tumores T1 é papilar, de baixo ou alto grau e os T2-T4 são carcinomas não papilares de alto grau (EBLE *et al.*, 2004). Cerca de 75% dos CUBs recém-diagnosticados são não-invasivos e têm uma alta taxa de recorrência e progressão apesar da terapêutica

local. Os restantes 25% apresentam invasão muscular e precisam de cirurgia radical ou radioterapia, mas mesmo com terapia sistêmica os resultados ainda são pobres, tornando-se um fardo sobre os sistemas de saúde (BURGER *et al.*, 2013). Dentre os tumores malignos de bexiga, as neoplasias superficiais são as mais comuns e os pacientes apresentam risco de 60% a 90% de recorrência e 30% a 50% de progressão da doença que podem levar à invasão da camada muscular (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA – AMB, 2006).

Apesar dos recentes avanços no tratamento multidisciplinar, os CUB continuam a atingir taxas de mortalidade e morbidade inaceitavelmente altas, com uma taxa de sobrevivência de 10 anos em 40% a 50% dos casos (SCHULTZ *et al.*, 2010), podendo-se constatar que continuam sendo um grave problema de saúde pública.

Aproximadamente 30 a 50% dos pacientes com CUB invasor desenvolvem a doença metastática e morre no prazo de 2 anos após diagnóstico. Além disso, praticamente todos os pacientes com diagnóstico de metástases à distância sucumbem à doença.

1.1.3. SINAIS e SINTOMAS

O tipo e a gravidade dos sinais clínicos e sintomas do CUB depende da extensão e localização do tumor. A grande maioria dos CB é diagnosticada como resultado da avaliação de pacientes com hematúria (sangue na urina), que pode levar a coagulação e micção dolorosa. Além disso, sintomas que irritam a mucosa da bexiga como disúria, frequência e urgência urinária, geralmente estão associados com câncer invasivo da bexiga (EBLE *et al.*, 2004; KIRKALI *et al.*, 2005).

A capacidade da bexiga pode ser reduzida no caso de tumores com grande volume, resultando em frequência urinária alta e urina pouco abundante. Pacientes com estado avançado da doença podem apresentar perda de peso, dor abdominal ou óssea em função de metástases (EBLE *et al.*, 2004; KIRKALI *et al.*, 2005).

1.1.4. DIAGNÓSTICOS

Embora a suspeita de CB possa ser estabelecida em exames de ultrassonografia ou tomografia computadorizada, a confirmação do diagnóstico é

realizada por meio da cistoscopia juntamente com citologia urinária (EBLE *et al.*, 2004).

De acordo com publicações da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) e da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP), a cistoscopia, por proporcionar a visualização direta da mucosa da bexiga, é considerada atualmente um exame referência para neoplasias vesicais tanto para tratamento e diagnóstico quanto para controle das recorrências. Contudo, é uma técnica pouco aceitável para o paciente já que é um método invasivo e que gera desconforto mesmo com anestesia local (LAMM, 1998; DIBB *et al.*, 2001).

Atualmente, os testes não invasivos que estão em fase de avaliação ou em utilização na prática clínica como testes de triagem para CB são: citologia urinária, antígeno tumoral da bexiga, teste de proteína nuclear de matriz, ensaio do produto de degradação da fibrina e teste de ácido hialurônico (hialuronidase na urina), contudo, a eficiência da cistoscopia ainda é utilizada como padrão ouro para estabelecimento do prognóstico (TANAKA *et al.*, 2011; EVELYNE; ROSETTE; REIJKE, 2011). Outro método de diagnóstico de CB é por meio da análise microscópica da urina (citologia urinária), na qual é detectada a hematúria, um dos principais sintomas da doença. Esta técnica, de fácil coleta e não invasiva é altamente específica no diagnóstico de tumores invasivos, carcinoma in situ (CIS) e carcinoma papilar de alto grau, porém pouco confiável em detectar tumores papilares de baixo grau (BROWN, 2000; FLEZAR, 2010).

A ressecção transuretral (RTU) é recomendada tanto para diagnóstico como para tratamento de CB. Esta técnica resseca as células tumorais e suprime as precursoras do tumor, diminuindo, portanto, as taxas de recorrência e progressão (HENEY *et al.*, 1988; PARMAR *et al.*, 1989). A desvantagem desta técnica é em função do seu alto grau de invasividade e pelas repetidas lesões provocadas no local que podem levar ao aumento do risco de recorrência e progressão (GRIMM *et al.*, 2003). Portanto, nestes casos, a terapêutica cirúrgica é acompanhada por terapias intravesicais utilizando quimioterápicos ou imunoterapia profilática tais como a aplicação de BCG intravesical (HERR, 1999).

Outros métodos não invasivos que podem ser recomendados para casos mais avançados, como detecção de metástase, são os exames de ultrassonografia

trans-abdominal, tomografia computadorizada e ressonância magnética, porém são métodos limitados na capacidade de detectar o tumor no estágio inicial e são inadequados para a realização do estadiamento tumoral (KIRKALI *et al.*, 2005).

1.1.5. TRATAMENTOS

O tratamento para o CB requer diferentes métodos de controle por estar associado à biologia tumoral, ao prognóstico, ao grau de metástase e às características individuais de cada paciente, como histórico médico e idade e tem por objetivo prevenir ou retardar a progressão da doença para estados mais avançados ou morte, possibilitando sobrevida longa com boa qualidade de vida (DIAS *et al.*, 2006; GALSKEY; HALL, 2010). O CB é usualmente tratado com quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e cirurgia utilizada de forma exclusiva ou em combinação (DIAS *et al.*, 2006; NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI).

O procedimento inicial para diagnóstico e tratamento de CB é a RTU que é indicada para todos os casos de tumores ou de lesões vesicais suspeitas. Atualmente, o tratamento mais eficiente e padrão para CUB invasivo é a cistectomia radical, na qual são retirados bexiga, órgãos adjacentes e gânglios linfáticos da região (VISHNU; MATHEW; TAN, 2011; WITJES *et al.*, 2014).

A quimioterapia sistêmica com base em cisplatina (CPT) apresenta maior taxa de resposta e geralmente é reservada para pacientes com doença metastática por aumentar a probabilidade de erradicar micrometástases e dessa forma, melhorar a sobrevivência dos pacientes (VISHNU; MATHEW; TAN, 2011).

Na quimioterapia intravesical, os medicamentos são administrados diretamente na bexiga por meio de um cateter. A aplicação desta terapia deve ocorrer em até 6 horas após a RTU e a escolha do fármaco (mitomicina C, epirrubicina ou doxorubicina) é opcional. Este tratamento reduz o risco de recorrência, mas não sua progressão (BABJUK *et al.*, 2009).

A terapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) ou imunoterapia intravesical é considerado um tratamento superior à quimioterapia intravesical e, portanto, o mais eficaz na redução de recorrências e na prevenção ou atraso da progressão para CUB invasivo (BABJUK *et al.*, 2009).

O BCG é uma vacina atenuada preparada a partir da bactéria *Micobacterium bovis*, causadora da tuberculose bovina, inicialmente utilizada como vacina contra a tuberculose e que, por reduzir de forma significativa as taxas de recidiva tumoral, é atualmente a terapia mais eficaz no tratamento de CB (MUNGAN; WITJES, 1998; BABJUK *et al.*, 2009).

Podemos inferir que grande parte do desenvolvimento de novas formas de tratamento está atrelado à utilização de modelos confiáveis que permitam testar as modalidades terapêuticas. No caso dos tumores de bexiga, os testes utilizando modelos de linhagem celulares e animais são os métodos mais empregados para avaliação na área.

1.2. MODELO EXPERIMENTAL COM CÉLULAS MB49

As linhagens celulares mais utilizadas para estudos de carcinoma de bexiga são a MB49 e MBT-2, que foram obtidas de camundongos C57BL/6 e CH3, respectivamente. A linhagem celular MB49 foi desenvolvida a partir de um tumor induzido com o composto 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) no epitélio de bexiga de camundongos C57BL/6 machos. O modelo de indução utilizando a linhagem celular MB49 para estudos de carcinoma de bexiga é considerado o mais semelhante ao câncer humano, devido aos marcadores de superfície celular, perfil imunológico e a sensibilidade à apoptose (LOSKOG *et al.*, 2005).

1.3. SISTEMA IMUNE E O CÂNCER

O microambiente tumoral por meio da sua contribuição na iniciação, na progressão e nas respostas ao tratamento é fundamental para a biologia do tumor. As células e as moléculas do sistema imunológico são um componente fundamental do microambiente tumoral. Análises histopatológicas de neoplasias malignas mostraram que números variados de diferentes células associadas com resposta imune são encontrados em diferentes tumores ou locais, dentro ou em torno das lesões (BERAL; NEWTON, 1998; ENGELS *et al.*, 2008).

A relação entre as características fenotípicas das células que compõem o infiltrado e o desfecho clínico também já foi bem estabelecida. Sabe-se que para a maioria das neoplasias malignas, a presença de linfócitos CD4⁺ do tipo Th1 está correlacionada com melhores desfechos clínicos do que os mesmos tipos de tumores infiltrados por Treg, Th2 ou Th17. (FRIDMAN *et al.*, 2012). Por outro lado, pacientes com algum tipo de imunodeficiência congênita ou adquirida apresentam aumento da incidência de tumores, particularmente daqueles associados com infecções virais (BERAL; NEWTON, 1998; ENGELS *et al.*, 2008).

Neste contexto, a ideia de utilizar o sistema imunológico para tratar o câncer foi sendo maturada e formalmente introduzida pelo cirurgião William B. Coley no início do século 20 na cidade de Nova York (EUA). Ele observou que a lesão tumoral de alguns pacientes com sarcoma sofrera regressão espontânea e que esta involução tinha sido associada com a presença da doença erisipela, uma infecção dermatológica causada pela bactéria *Streptococcus pyogenes*. Após tal constatação, Coley injetou intencionalmente uma mistura de lisados bacterianos mortos, que mais tarde foram chamados de Toxinas de Coley, em pacientes com câncer, obtendo resultados bastante satisfatórios (STARNES, 1992). William Coley tornou-se, desta forma, o patrono da imunoterapia do câncer, pois foi o primeiro a reconhecer o potencial do sistema imunológico no tratamento deste tipo de doença (HOFMAN *et al.*, 2010).

Apesar da importante atuação do sistema imunológico, as lesões malignas continuam a surgir e progredir em indivíduos considerados imunocompetentes. Provavelmente, o fato de a célula neoplásica compartilhar antígenos com as células normais, de possuir alta taxa de crescimento e sofrer edição contribuem para a sua resistência em relação à resposta imunológica anti-tumoral (EVAN; VOUSDEN, 2001).

Células cancerígenas surgem a todo o momento em todo o corpo, porém processos naturais, tais como a apoptose e imunovigilância eliminam esses tipos de células antes que os tumores evoluam (EVAN; VOUSDEN, 2001). No entanto, nos casos em que existe o estabelecimento da neoplasia maligna, num primeiro momento, a maioria das células malignas reconhecidas pelo sistema imune é

eliminada, enquanto que um pequeno número de células que não são reconhecidas sobrevive.

A seleção repetida de células imunologicamente silenciosas promove a formação de uma massa tumoral. Este microambiente manifesta predominantemente atividade imunossupressora em função da secreção de citocinas inibidoras e recrutamento de células reguladoras que desativam as células imunes específicas contra o tumor e favorece o estabelecimento e desenvolvimento do câncer (DUNN *et al.*, 2004).

Apesar desse contratempo, a resposta imunológica continua sendo uma das melhores apostas no tratamento das neoplasias malignas, pois seus componentes celulares e humorais podem alcançar e destruir alvos nos mais diversos locais do organismo.

1.4. MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA

Nos últimos anos surgiu o conceito de morte celular imunogênica (ICD), ou seja, uma modalidade de morte celular por apoptose, que estimula uma resposta imune contra antígenos de células mortas, em particular quando eles derivam de células de câncer (GREEN *et al.*, 2009). Esse conceito surgiu quando foi verificado por meio de estudos clínicos que medicamentos citotóxicos tinham uma atuação antitumoral mediada por resposta imune específica contra as células neoplásicas (ZITVOGEL *et al.*, 2011).

A morte celular, de forma geral, pode ser classificada com base em vários parâmetros como, por exemplo, morfológicos (morte necrótica, autofágica, associada à mitose ou apoptose), enzimológicos (sem envolvimento de nucleases ou incluindo proteases, como caspases ou catepsinas), aspectos funcionais (programada ou acidental) e imunogênicos (imunogênica ou não-imunogênica) (GALLUZZI *et al.*, 2007). Dito isso, a morte celular homeostática, que muitas vezes ocorre por meio de apoptose, é considerada como um tolerôgeno ou como um valor nulo, não exercendo nenhum impacto sobre o sistema imunitário (MELIS *et al.*, 2013; KEPP *et al.*, 2014).

A ICD depende de estímulos específicos para matar células enquanto provocam a emissão coordenada de sinais imunogênicos (KEPP *et al.*, 2014). A morte celular imunogênica (ICD) envolve mudanças na composição da superfície celular, bem como a liberação de mediadores solúveis, ocorrendo em uma sequência temporal definida. Tais sinais operam em uma série de receptores expressos por células dendríticas para estimular a apresentação de antígenos tumorais às células T (KROEMER *et al.*, 2013).

Esses sinais são transmitidos por padrões moleculares associados a danos (DAMPs), ou seja, moléculas que não são acessíveis pelo sistema imunológico em condições fisiológicas, mas são liberadas ou expostas no folheto externo da membrana plasmática durante as respostas de estresse citoprotéico ou de morte celular. Semelhante às suas contrapartes microbianas, muitos DAMPs (mas não todos) exercem efeitos imunoestimuladores robustos após a ligação aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos pelas células imunológicas (KEPP *et al.*, 2014).

São 3 DAMPs que exercem papel fundamental no potencial imunogênico de praticamente todos os indutores de ICD: a calreticulina (CALR) exposta à superfície, a liberação de ATP e a liberação da proteína B1 de grupo de alta mobilidade (HMGB1) (KRYSKO, 2012). Juntos, estes promovem a aquisição de células tumorais apoptóticas por células dendríticas (DCs); melhoram o processamento de antígeno dependente do receptor 4 do tipo Toll-like (TLR4) e a apresentação cruzada por DCs; e estimulam a produção de interleucina-1 β que é necessária para o preparo eficaz de células T CD8 específicas de tumores (MELIS *et al.*, 2013).

A CALR é exposta na superfície celular no início de ICD, isto é, antes da fosfatidilserina associada à apoptose também estar no folheto externo da membrana plasmática. Exposta à membrana, a CALR proporciona um sinal fagocítico importante às células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) tais como células dendríticas, melhorando de fato sua capacidade de absorver células mortas e seus cadáveres. (KEPP *et al.*, 2014).

Os efeitos estimuladores da fagocitose da CALR são contrabalançados pelo CD47, que é altamente expresso por uma grande variedade de tumores sólidos e hematopoiéticos. Esta última observação sugere que várias neoplasias se

beneficiam do mecanismo que inibe a eversão da CALR na membrana externa. Provavelmente esse processo seja utilizado para evitar a ativação de resposta imune adaptativa contra as células malignas, que sucumbem "fisiologicamente" ao longo da oncogênese e progressão tumoral. Alternativamente, a atividade inibidora de fagocitose exercida pelo CD47 pode conferir aos tumores alguma vantagem, aumentando a disponibilidade local de macromoléculas derivadas de sua morte espontânea e degradação de alguns de seus constituintes celulares. Esta possibilidade ainda não foi abordada experimentalmente (KEPP *et al.*, 2014).

A liberação de ATP associada ao ICD ocorre através de um mecanismo complexo. O ATP extracelular opera como um forte quimioatraente e promove não só o recrutamento de células imunes para os sítios de ICD, mas também a sua diferenciação (KEPP *et al.*, 2014).

A liberação do HMGB1 das células que sucumbem ao ICD requer a permeabilização das membranas nucleares e plasmáticas, constituindo de fato um evento pós morte. Embora a autofagia tenha sido proposta para contribuir para a liberação de HMGB1 de células moribundas, pelo menos em algumas circunstâncias, a maquinaria molecular subjacente a essa manifestação crucial da ICD ainda não foi esclarecida em detalhes. Dito isto, o HMGB1 extracelular é bem conhecido por mediar vigorosos efeitos pró-inflamatórios após a ligação a vários receptores na superfície das células imunes, incluindo TLR2, TLR4 e receptor específico de produto final de glicosilação (RAGE) (KEPP *et al.*, 2014).

Além destas 3 DAMPs, existem muitas outras que contribuem para a imunogenicidade da morte celular. São elas: as citocinas imunoestimuladoras como interferon α (IFN- α), várias chaperonas da família de proteínas de choque térmico (HSP) como a HSPA1A mais conhecida como HSP70 e HSP90AA1 também conhecida como HSP90, metabólitos de esfingomielina, por exemplo, ceramida e esfingosina-1-fosfato, uma série de produtos mitocondriais como, DNA mitocondrial, peptídeos N- formilados e cardiolipina, componentes citosólicos como urato e F-actina, bem como produtos da quebra da matriz extracelular, como fragmentos de hialuronano (KEPP *et al.*, 2014).

Vários trabalhos vêm demonstrando que alguns quimioterápicos que já são empregados no tratamento de neoplasias possuem a capacidade de induzir em

células neoplásicas apoptose imunogênica (ICD), e quando essas células são introduzidas no organismo sem o auxílio de adjuvantes produzem uma resposta imune capaz de reconhecer e combater as células tumorais (MELIS *et al.*, 2013; KEPP *et al.*, 2014).

A mitoxantrona (MTX) e as antraciclina (daunorrubicina, doxorrubicina e epirrubicina) vêm demonstrando uma alta capacidade de indução de ICD em diferentes linhagens de células tumorais. Já a CPT, apesar de sua capacidade de induzir apoptose, nessas mesmas linhagens essa morte não é considerada imunogênica (KEPP *et al.*, 2014).

1.5. CARACTERIZAÇÃO DOS QUIMIOTERÁPICOS

As antraciclina são classificadas como uma das mais efetivas classes de drogas anticâncer já desenvolvidas. A primeira antraciclina descoberta foi na década de 1950 através do isolamento da daunorrubicina (DAU) a partir da bactéria *Streptomyces peucetius* (MINOTTI *et al.*, 2004).

Atualmente, a mais utilizada é a doxorrubicina (DOX), descoberta na década de 1960, porém, enquanto a DAU é utilizada principalmente no tratamento de leucemias, a DOX é utilizada como medicamento de primeira linha no tratamento de câncer de mama, ossos, sarcoma de tecidos moles, bexiga, linfomas e mielomas múltiplos (BINASCHI *et al.*, 2001; MINOTTI *et al.*, 2004; NETO, 2013). Outra antraciclina amplamente utilizada é a epirrubicina (EPI), um análogo estrutural da DOX, que foi desenvolvido nos anos 80 na Itália (BONFANTE *et al.*, 1980) e é usada principalmente no tratamento de câncer de mama, esôfago e câncer gástrico (NETO, 2013; POMMIER, 2013). A EPI permitiu melhoras na farmacocinética e metabolismo, como um elevado volume de distribuição e uma eliminação mais rápida (MINOTTI *et al.*, 2004).

Provavelmente as antraciclina entram de forma inalterada nas células por meio de difusão passiva. Quanto mais lipofílica for a molécula de antraciclina, maior será sua taxa de transporte, sendo assim, essa taxa dependa da lipossolubilidade do fármaco. Além disso, devido ao pH intracelular mais baixo, grande parte das moléculas sofre o processo de protonação (DEN BOER *et al.*, 1999).

Os efeitos anticarcinogênicos das antraciclinas são mediados principalmente pela inibição da transcrição e replicação do DNA, mas também produzem radicais livres derivados de oxigênio que causam danos diretos às proteínas, lipídios e ao DNA. Evidências sugerem que o conhecido poder cardiotoxico dessas drogas, que causa a apoptose do cardiomiócito está relacionada ao estresse oxidativo causado por esses processos (SMITH *et al.*, 2010).

A administração de DAU e DOX para tratamento de vários tumores humanos, causa uma cardiopatia dose dependente cumulativa (ZHOU; PALMEIRA; WALLACE, 2001) devido à ruptura no metabolismo basal do tecido cardíaco (KALENDER; YEL; KALENDER, 2005). Esses medicamentos induzem à cardiotoxicidade, pois ocorre a geração de radicais livres, estimulação de peroxidação lipídica acompanhados de alteração na integridade da membrana celular que é mediada pela alteração da função mitocondrial, além disso, a nefrotoxicidade é também um dos importantes efeitos dos antibióticos antraciclínicos (ZHOU *et al.*, 2001).

Em estudos clínicos, a EPI se mostrou ativa em vários tipos de tumores e causou menos danos cardíacos que a DOX quando comparadas doses cumulativas semelhantes, sendo está redução na toxicidade atribuída a modificação do grupo hidroxil na posição 4 da estrutura química da molécula, o que leva a uma eliminação mais rápida do fármaco e por consequência menos danos à célula (BONFANTE; VILLANI; BONADONNA, 1982; GANZINA, 1983; TORTI, 1986; Cancer Agency, 2006).

Desenvolvida na década de 1970 como agente antineoplásico, a MTX é derivada da família das antracenedionas (SCOTT; FIGGITT, 2004) sendo equivalentes às antraciclinas (MORRISSEY; Le PAGE; EDAN, 2005). Originalmente foi sintetizada com o objetivo de encontrar análogos com menor cardiotoxicidade, mas que mantivessem a potente citotoxicidade e apesar do composto inicial desta classe apresentar efeitos modulatórios sobre o sistema imune, mais tarde foi demonstrada sua significativa atividade sobre tumores murinos (AU *et al.*, 1981).

Assim como as antraciclinas, a MTX intercala-se ao DNA inibindo sua replicação e impede também a síntese de RNA e proteínas, além de suprimir a proliferação celular e induzir aberrações nucleares e alterações estruturais em

células tumorais (SAFA; TSENG, 1984; WHITE; DURR, 1985; PELFREY et al., 2006), pois interage com a enzima topoisomerase II responsável pela quebra das cadeias do DNA (NEUHAUS; KIESEIER; HARTUNG, 2004; CALABRESI; CHABNER, 2005). Devido a sua capacidade de se intercalar ao DNA, esse fármaco é utilizado para inibir a proliferação de células cancerosas no tratamento do câncer de mama, câncer de próstata, linfomas não-Hodgkin, e certos tipos de linfomas (FISHER; PATTERSON, 1991; AN; MORRIS, 2012).

Entre diversos análogos, a MTX apresentou melhor atividade, inclusive quando comparada a DOX, sendo selecionada posteriormente para estudos clínicos devido a sua potência e excelente atividade antitumoral em camundongos (AU *et al.*, 1981; WHITE; DURR, 1985). Ainda assim, da mesma forma que as antraciclinas, evidências tem mostrado que o uso da MTX também é capaz de induzir à cardiotoxicidade a longo prazo e que os seus metabólitos também podem estar envolvidos nesse processo (ROSSATO *et al.*, 2014b).

A toxicidade da MTX em células cardíacas é mais pronunciada após a sua metabolização e envolve diversas alterações celulares, como diminuição dos níveis intracelulares de ATP, inibição da expressão e atividade da ATPsintase, alterações no potencial de membrana mitocondrial e elevação dos níveis intracelulares de cálcio, ocasionando um desequilíbrio energético. Verificou-se também que além de toxicidade cardíaca, ocorre hepato e hematotoxicidade nos tratamentos com MTX (ROSSATO *et al.*, 2014a).

O desequilíbrio na regulação dos níveis intracelulares de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é outro possível mecanismo envolvido em que o MTX é o causador de um efeito mais pronunciado do que a DOX, o que poderia contribuir para a cardiotoxicidade reduzida da MTX quando comparada a DOX (CHUGUN *et al.*, 2008).

A MTX apesar de bem tolerada, em altas doses pode causar efeitos secundários como mielossupressão caracterizada por leucopenia e neutropenia (6% - 50%), com efeito mínimo sobre as plaquetas e eritrócitos; granulocitopenia que pode resultar em leves a severas infecções incluindo no trato urinário (7%), pneumonia (9%), bacteremia/sepsis (34%) e infecções fúngicas (9 - 15%). Ocasionalmente o paciente em tratamento com o fármaco pode apresentar náuseas

e vômitos (31 – 72%), alopecia e estomatite (7 – 29%). Contudo, a cardiotoxicidade é ainda o efeito mais grave atribuído ao uso induzindo cardiomiopatias, como taquicardia, arritmia e insuficiência cardíaca congestiva sintomática (PERICOT; MONTAIBAN, 2003). O aumento do risco de cardiotoxicidade está associado ao aumento cumulativo das doses de MTX, assim como, à pré-disposição a doenças cardiovasculares (MORRISSEY, LE PAGE, EDAN, 2005).

A CPT foi sintetizada pela primeira vez em 1875 e é um fármaco antineoplásico altamente efetivo em uma grande variedade de neoplasias humanas e animais, principalmente no tratamento dos tumores de testículo e ovário, câncer de cabeça e pescoço e carcinomas de bexiga e pulmão (ROSENBERG, 1985). Entretanto, devido ao surgimento de efeitos adversos, este fármaco tem sua utilidade clínica limitada, já que causa náuseas e vômito, hipomagnesemia, supressão da medula óssea, ototoxicidade e, principalmente, nefrotoxicidade, pois estes danos levam a uma diminuição da capacidade de filtração dos rins com o consequente decréscimo do clearance da creatinina (JONES *et al.*, 1985).

A ação da CPT ocorre por meio de uma reação intracelular, onde as moléculas de cloro da posição *cis* são substituídas por água ou grupos hidroxil transformando-a num composto tão reativo que pode levar a uma alquilação das bases púricas e pirimídicas do DNA (HALABE; WONG; STTON, 1991). Além disso, pode se ligar ao DNA nuclear e interferir nos processos de duplicação e transcrição; interagir com as bases púricas do DNA e promover ligações inter e intracadeias; induzir aberrações cromossômicas e gerar espécies reativas de oxigênio (YANG; WANG, 1996).

Em específico, a CPT se liga preferencialmente às bases de guanina do DNA numa ligação cruzada, interferindo com a função vital da célula e em sua mitose (DAVIES; BERNERS-PRICE; HAMBLEY, 2000) resultando não somente em células tumorais afetadas, mas também em tecidos normais do paciente (OSANTO *et al.*, 1991).

Ainda que esses fármacos apresentem resultados promissores no tratamento do câncer de bexiga, eles são ineficazes na cura do paciente em fase evolutiva da doença, além de apresentarem um problema fundamental que é sua atuação não

seletiva nas células do sistema imune, o que leva aos efeitos colaterais graves em diversos tecidos supracitados (JONES; COLES, 2010).

Apesar dos avanços na descoberta dos mecanismos envolvidos na morte celular associado às várias linhagens tumorais, nenhum trabalho até o presente momento avaliou sua eficácia em modelo de câncer de bexiga induzida pelos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento dessa doença. Portanto, a proposta deste trabalho foi comparar a capacidade dos quimioterápicos mitoxantrona, daunorubicina, doxorubicina e epirrubicina em induzir morte celular em células da linhagem MB49.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer urotelial de bexiga, por ser uma das neoplasias mais comuns no mundo e por apresentar grandes taxas de progressão, recorrência e mortalidade faz com que essa doença tenha um grande peso para o sistema de saúde pública, pois o tratamento dessa doença é um dos mais dispendiosos (YEUNG; DINH; LEE, 2014). Quase 60% do custo total do tratamento é gasto com a vigilância e tratamento de tumores recorrentes, principal motivo que o torna um fardo para o sistema de saúde pública (AVRITSCHER *et al.*, 2006).

Apesar do câncer de bexiga ser um problema comum, ainda não houve grandes avanços nos métodos diagnósticos, de vigilância e de tratamento. Métodos de vigilância como a cistoscopia são muito invasivos e os tratamentos como a instilação de BCG, a quimioterapia e a cistectomia tem se mostrado pouco efetivos, refletindo nas altas taxas de recorrência levando à necessidade de novos estudos para tratamentos e diagnósticos menos invasivos e mais efetivos.

Uma das alternativas para um tratamento mais efetivo pode estar na imunoterapia utilizando as próprias células tumorais do paciente, fazendo com que as células do sistema imune reconheçam antígenos específicos contra o tumor e o destrua.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é investigar a capacidade dos quimioterápicos mitoxantrona, daunorubicina, doxorubicina e epirubicina em induzir morte celular em células da linhagem MB49 de tumor urotelial de bexiga *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho objetiva:

1. Quantificar a viabilidade celular; por meio de ensaios colorimétricos, na presença dos quimioterápicos;
2. Quantificar a viabilidade celular; por meio de ensaios colorimétricos, após 24h da retirada dos quimioterápicos;
3. Discriminar o tipo de morte celular através de testes de viabilidade celular;
4. Determinar o maior pico de apoptose para cada quimioterápico testado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

Células da linhagem MB49 provenientes de tumor urotelial de bexiga de camundongos da linhagem C57BL/6 foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (Cultilab®, São Paulo – SP, Brasil) contendo 2mmol/L de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino (Cultilab®, São Paulo – SP, Brasil) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina 10,000U (Vitrocel Embriolife, Brasil). A cultura celular foi mantida em estufa a 37°C e 5 % CO₂ em garrafas de 75 cm² e utilizada após atingir 90% de confluência (ANDRADE *et al.*, 2010). As células aderentes foram removidas da superfície com adição de tripsina a 0,25% (Life Technologies, EUA) e contadas em câmara de Neubauer com o auxílio da solução de azul de Trypan a 0,4% (Gibco, Life Technologies, EUA) para quantificação da viabilidade celular.

4.2. VIABILIDADE DA CULTURA DE CÉLULAS MB49 COM QUIMIOTERÁPICOS

Para o ensaio de viabilidade celular, foram utilizados cinco quimioterápicos (cisplatina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina e mitoxantrona), em suas formulações farmacêuticas convencionais para tratamento de pacientes (tabela 1).

Tabela 1: Dados dos quimioterápicos utilizados.

Quimioterápico	Nome Comercial	Fabricante
Cisplatina	C-Platin®	Blau Farmacêutica S.A.
Daunorrubicina	Evoclass®	Fármaco Uruguayo S.A.
Doxorrubicina	Fauldoxo®	Libbs Farmacêutica LTDA.
Epirrubicina	Cloridrato de Epirrubicina	IntasPharmaceuticals LTD.
Mitoxantrona	Evomixan®	Fármaco Uruguayo S.A.

A aquisição dos quimioterápicos nessas condições se deu por dois fatores, o primeiro a sua acessibilidade financeira e o segundo fator por estarem mais próximo da realidade terapêutica.

Os quimioterápicos escolhidos foram então divididos em 5 grupos: grupo CPT (cisplatina), grupo DAU (daunorrubicina), grupo DOX (doxorrubicina), grupo EPI (epirubicina), e grupo MTX (mitoxantrona). Também foi criado um grupo controle (CTL) em que não foi utilizado nenhum quimioterápico. Assim, realizou-se um primeiro ensaio de viabilidade utilizando 3 concentrações e 3 tempos (6h, 12h e 24h) diferentes para cada grupo.

O ensaio colorimétrico da resazurina (Sigma-Aldrich®, EUA) é empregado em testes de viabilidade e citotoxicidade celular, como utilizado por O'BRIEN *et al.*, (2000), no qual o nível de redução da resazurina pode ser quantificado por espectrofotômetros, uma vez que a resazurina exibe um pico de absorção a 600nm e a resorufina a 570nm de comprimentos de onda (BORRA *et al.*, 2009).

Para isso, as células MB49 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços a 1×10^5 células/poço, em estufa de CO₂ 5% a 37°C, em período *overnight*. O sobrenadante foi retirado e substituído por meio DMEM alta glicose fresco contendo os quimioterápicos nas concentrações conforme a tabela 2 em quadruplicada. A escolha das concentrações foi baseada em trabalhos semelhantes (HAN *et al.*, 1999; LOTFI; ZACKRISSON; PETERSON, 2002; OBEID *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2011; ARNOLD *et al.*, 2013; INOUE; SETOYAMA; ADAKA, 2014, SUKKURWALA *et al.*, 2014; KEPP *et al.*, 2014), sendo que a concentração intermediária foi a encontrada na literatura. Poços contendo células cultivadas sem quimioterápico foram considerados como controle negativo.

Tabela 2: Concentrações usadas para o ensaio de viabilidade.

Quimioterápico	Concentrações em μM		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Cisplatina	100	50	25
Daunorrubicina	2	1	0,5
Doxorrubicina	50	25	12,5
Epirubicina	40	20	10
Mitoxantrona	4	2	1

Após cada término do período de incubação com os quimioterápicos, o meio de cultura das células foi retirado e substituído por meio fresco com solução de resazurina a 70 μM em todos os poços, retornando a cultura na estufa de CO₂ 5% a

37°C por 4 horas. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom ASYS UVM 340, Reino Unido) em comprimentos de onda de 570nm e 600nm. As placas contendo as células receberam meio fresco e retornaram à estufa por mais 24h. Este procedimento foi realizado para verificar o efeito dos quimioterápicos sobre o crescimento das células tumorais após a remoção dos mesmos. Após esse período, foi adicionada novamente solução de resazurina a 70µM em todos os poços, retornando a cultura à estufa de CO₂ 5% a 37°C por 4 horas.

O sobrenadante foi novamente transferido para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570nm e 600nm.

Para o cálculo da viabilidade foi utilizada a fórmula a seguir, em que a viabilidade foi calculada a partir da subtração da absorbância das células vivas, de cada grupo tratado, da média da absorbância dos poços com resazurina, em relação à subtração da média da absorbância do grupo controle (CTL6h), da média da absorbância dos poços com resazurina.

$$Viabilidade = \frac{Tratamento - Média\ resazurina}{Média\ controle - Média\ resazurina}$$

4.3. DISCRIMINAÇÃO E DETECÇÃO DE MORTE CELULAR *IN VITRO*

Com o teste anterior pode-se conhecer o efeito das drogas sobre viabilidade das células MB49, mas não foi possível distinguir em que momento ou em quais doses as células morriam por apoptose, então, com esse ensaio é possível ter uma melhor avaliação sobre esse efeito.

Para isso, foram realizados mais alguns ensaios de viabilidade, porém com 2 tempos diferentes de exposição aos quimioterápicos, sendo estes de 2h e 24h como descrito por HELM *et al.*(2017). Dessa forma, as células MB49 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços a 2x10⁵ células/poço, em estufa de CO₂ 5% a 37°C, em período *overnight*. O sobrenadante foi retirado e substituído por meio DMEM alta glicose fresco contendo os quimioterápicos em 7 concentrações diferentes conforme

a tabela 3 em quadruplicada. A escolha das concentrações foi baseada no experimento anterior. Poços contendo células cultivadas sem quimioterápico foram considerados como controle negativo.

Tabela 3: Concentrações usadas para o ensaio de discriminação de morte celular.

Quimioterápico	Concentrações em μM						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
Cisplatina	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562
Daunorrubicina	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
Doxorrubicina	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781
Mitoxantrona	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062

Após cada término do período de incubação com os quimioterápicos o meio de cultura das células foi retirado e substituído por meio fresco com solução de resazurina a $60\mu\text{M}$ em todos os poços, retornando a cultura na estufa de CO_2 5% a 37°C por 2 horas. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570nm e 600nm . Como controle positivo de apoptose foi utilizado uma curva dose-resposta de H_2O_2 .

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPadPrism 5 e a análise estatística para o ensaio de viabilidade celular foi a ANOVA de uma via para comparar médias, com uma significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EFEITO DOS QUIMIOTERÁPICOS NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MB49

Como descrito anteriormente, o CUB é uma das neoplasias mais comuns no mundo e por apresentar grandes taxas de progressão, recorrência e mortalidade faz com que essa doença tenha um grande peso para o sistema de saúde pública, pois o tratamento é um dos mais dispendiosos, principalmente porque quase 60% do custo total do tratamento é gasto com a vigilância e tratamento de tumores recorrentes (AVRITSCHER *et al.*, 2006; YEUNG; DINH; LEE, 2014).

Por isso, esse estudo teve como foco a análise do comportamento de células de CUB murino diante de quimioterápicos que possuem potencial de induzir morte celular imunogênica, com o objetivo de futuramente usá-las como vacina para imunizar os camundongos contra as células do próprio tumor.

As metodologias usadas na avaliação do potencial imunogênico das células mortas do tipo ICD requerem um controle de morte não imunogênico e por isso a CPT também foi incluída em nossas avaliações por produzir apoptose não imunogênica em diversas outras linhagens (KEPP *et al.*, 2014).

Ensaio colorimétricos por meio de resazurina têm sido frequentemente utilizados como indicadores de viabilidade celular em testes de citotoxicidade (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2000; ROLÓN *et al.*, 2006; BONNIER *et al.*, 2015). Deste modo, os efeitos dos quimioterápicos sobre a viabilidade das células tumorais foram comparados de acordo com o tempo e dose, bem como com os efeitos 24h após a retirada dos quimioterápicos. Assim, o primeiro grupo controle (CTL6h) foi utilizado com marco de viabilidade de 100%, dessa forma pôde-se mensurar a viabilidade em relação ao seu estado inicial (6h) e seu estado final (os demais tempos e após 24h sem quimioterápicos).

5.1.1. CITOTOXICIDADE DA CISPLATINA

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade, observou-se que a CPT diminuiu significativamente a viabilidade das células MB49 de modo dose-dependente (Figura 1).

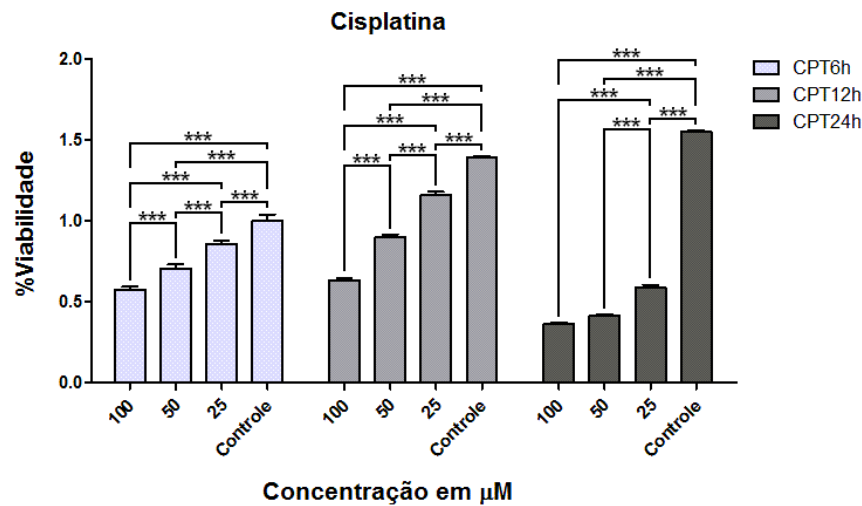


Figura 1: Citotoxicidade da cisplatina em relação às diferentes concentrações. As células foram expostas a três diferentes concentrações de cisplatina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados em relação à dose, permitiu verificar o perfil dose-dependente da cisplatina. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em triplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Também observa-se que no grupo CPT12h, com menor concentração (25 μ M), as células continuaram a crescer, porém em uma taxa menor em relação ao seu controle (Figura 1).

Os resultados do ensaio de viabilidade utilizado corroboram com o trabalho de GEOGHEGAN *et al.* (2017), em que o tratamento com CPT diminuiu a viabilidade celular utilizando linhagens de carcinoma de pulmão (H1299 e P31) de modo dose-dependente, sendo o efeito máximo de citotoxicidade observado na concentração de 100 μ mol/L de CPT.

Quando a viabilidade foi analisada em relação ao tempo de exposição, foi possível verificar um aumento estatístico da viabilidade no tempo intermediário (CPT12h) em relação aos outros dois grupos, exceto na concentração de 100 μ M (Figura 2).

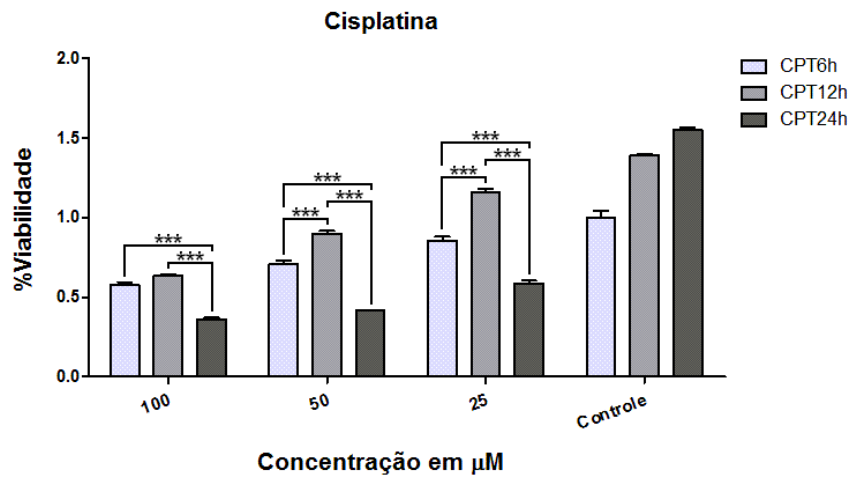


Figura 2: Citotoxicidade da cisplatina em relação ao tempo de exposição. As células foram expostas a três diferentes concentrações de cisplatina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados em relação ao tempo, permitiu verificar um aumento da viabilidade no tempo intermediário (CPT12h). Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Quando a CPT foi retirada e a quantificação da viabilidade celular foi realizada após as 24h subsequentes à retirada do medicamento, verificou-se que a viabilidade continuou a se comportar de modo dose-dependente, exceto entre as concentrações de 100µM e 50µM nos grupos CPT6h e CPT24h (Figura 3).

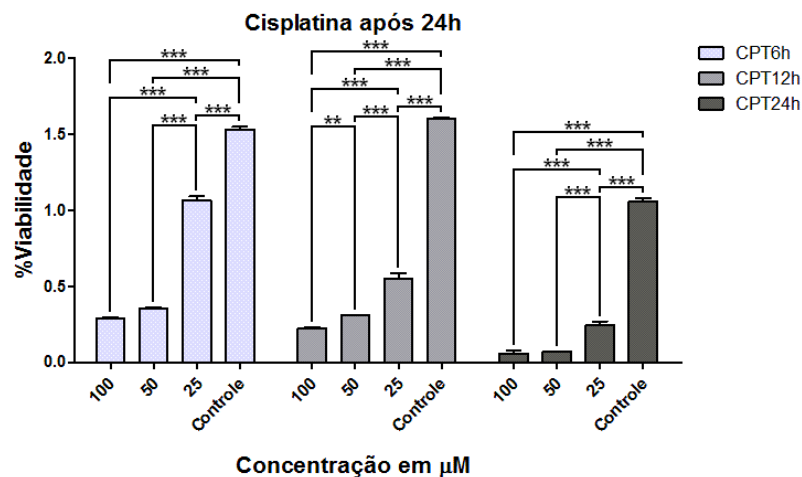


Figura 3: Citotoxicidade da cisplatina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à cisplatina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os testes de viabilidade mostraram que a cisplatina manteve o perfil dose-dependente. Os resultados representam

a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Também observou-se uma redução significativa da viabilidade para todos os grupos quando comparados ao controle. No grupo CPT6h, que recebeu a menor concentração (25 μ M), as células continuaram a crescer, porém em uma taxa menor em relação ao seu controle (Figura 3).

Além disso, foi possível verificar que a viabilidade passou a diminuir significativamente de modo tempo-dependente, exceto entre os grupos CPT6h e CPT12h nas doses de 100 μ M e 50 μ M (Figura 4).

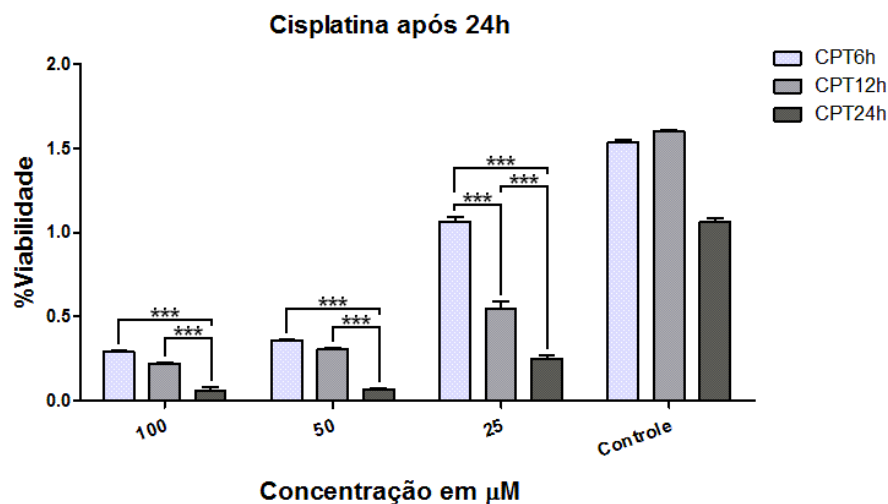


Figura 4: Citotoxicidade da cisplatina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à cisplatina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os testes de viabilidade mostraram que a cisplatina passou a se comportar de maneira tempo-dependente após esse período. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5.1.2. CITOTOXICIDADE DA DAUNORRUBICINA

HAMID *et al.* (2004) demonstraram que para a avaliação da DAU, o teste com resazurina é mais sensível do que outros métodos de quantificação, como ensaios utilizando MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio).

Os resultados do ensaio de viabilidade mostraram que a DAU diminuiu estatisticamente a viabilidade das células MB49 de modo dose-dependente, porém,

no grupo DAU6h, quando comparados as concentrações de 2 μ M e 1 μ M, não houve diferença significativa (Figura 5).

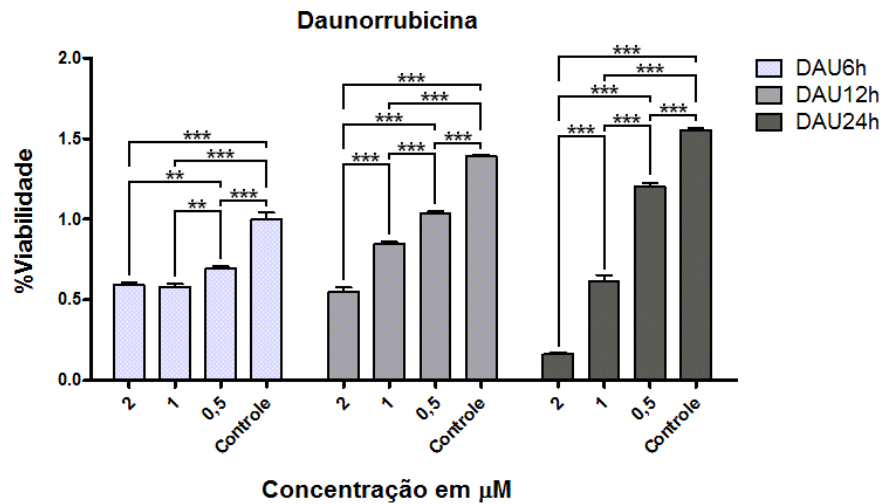


Figura 5: Citotoxicidade da daunorrubicina em relação às diferentes concentrações. As células foram expostas a três diferentes concentrações de daunorrubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados em relação à dose, permitiu verificar o perfil dose-dependente da daunorrubicina. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em triplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Nos grupos DAU12h e DAU24h, na menor concentração (0,5 μ M), as células continuaram a crescer, mas em uma taxa estatisticamente menor em relação aos seus controles (Figura 5).

Este resultado contrasta com o trabalho de TOSCAN *et al.* (2014) em que obtiveram 100% de morte celular após 24h de tratamento com DAU a 1 μ M, porém utilizando células de leucemia linfoblástica aguda, sugerindo que as células MB49 são mais resistentes uma vez que, sob as mesmas condições de tempo e de concentração, a DAU não foi capaz de diminuir a viabilidade abaixo dos 50%.

Já quando se analisa a viabilidade em relação ao tempo de exposição, observou-se uma divergência entre os grupos (Figura 6): na concentração de 2 μ M a viabilidade diminui conforme aumenta o tempo de exposição; na concentração de 1 μ M a viabilidade foi significativamente maior no tempo intermediário (DAU12h) em relação aos outros dois grupos; e na concentração de 0,5 μ M a viabilidade foi estatisticamente maior conforme aumentava o tempo de exposição.

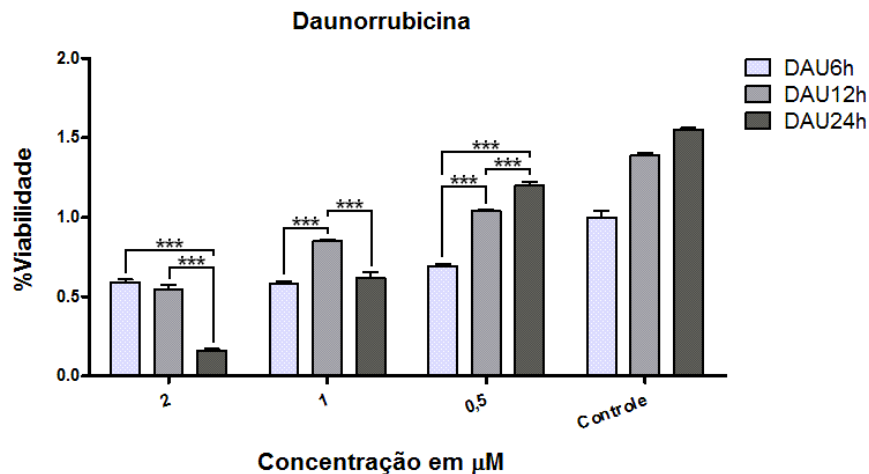


Figura 6: Citotoxicidade da daunorrubicina em relação ao tempo de exposição. As células foram expostas a três diferentes concentrações de daunorrubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. Não foi verificado um perfil de comportamento entre os grupos. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Quando a DAU foi retirada e a quantificação da viabilidade foi realizada após as 24h sem o quimioterápico, observou-se que a viabilidade continuou comportando de modo dose-dependente, significativamente entre todas as concentrações, inclusive no grupo DAU6h (Figura 7).

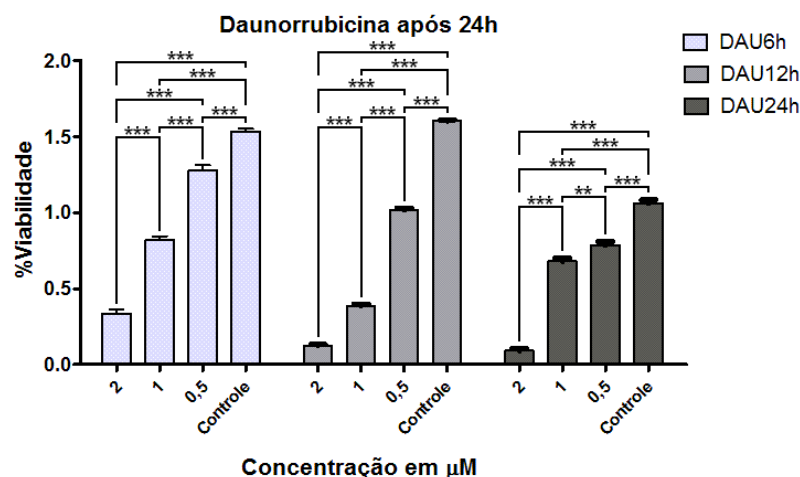


Figura 7: Citotoxicidade da daunorrubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à daunorrubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os grupos mantiveram o perfil dose-dependente. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Entretanto, quando se compara a viabilidade após as 24h sem o tratamento em relação ao tempo de exposição, na concentração de 1 μ M, a viabilidade no grupo DAU12h foi significativamente menor em relação aos outros dois grupos e, na concentração de 0,5 μ M, a viabilidade foi estatisticamente menor conforme aumentava o tempo de exposição. Na concentração de 2 μ M a viabilidade continuou diminuindo conforme maior o tempo de exposição (Figura 8).

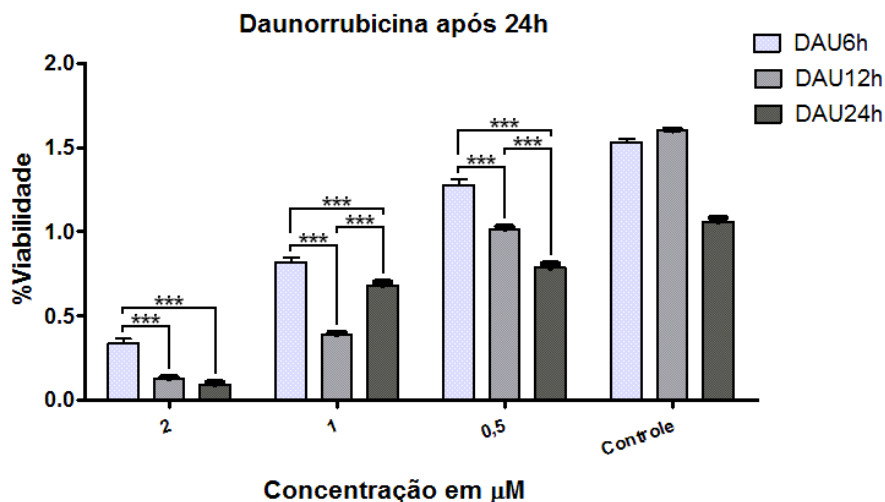


Figura 8: Citotoxicidade da daunorrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à daunorrubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os testes de viabilidade mostraram um perfil tempo-dependente somente para os grupos tratados com 2 μ M e 0,5 μ M. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5.1.3. CITOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA

De acordo com os dados obtidos, observou-se que a DOX diminuiu significativamente a viabilidade das células MB49, no entanto, não houve diferença estatística quando comparadas as diferentes concentrações, exceto entre as concentrações de 50 μ M e 12,5 μ M no grupo DOX12h (Figura 9).

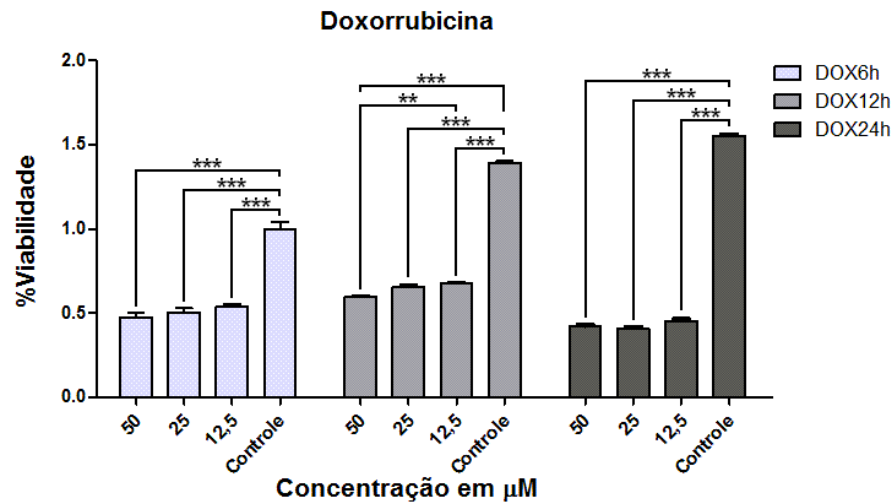


Figura 9: Citotoxicidade da doxorubicina em relação às diferentes concentrações. As células foram expostas a três diferentes concentrações de doxorubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados em relação à dose, permitiu verificar que não houve diferença significativa, exceto entre as concentrações de 50μM e 12,5μM no grupo DOX12h. Os resultados representam a média ± DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Em relação ao tempo de exposição, o tempo intermediário (DOX12h) apresentou viabilidade estatisticamente maior quando comparado aos dois outros grupos. Observou-se também que, com excessão da concentração de 50μM, o grupo DOX24h apresentou viabilidade significativamente menor quando comparado aos dois outros grupos (Figura 10).

ARAMVASH; CHADEGANI; LOTFI (2017) demonstraram que, utilizando altas concentrações de DOX (em relação ao presente trabalho) em células de medula, a viabilidade comportou-se de forma dose-dependente e, mesmo na concentração de 150μM, a viabilidade ainda foi superior a 50%. O resultado difere do encontrado neste trabalho, em que, em menores concentrações, a viabilidade foi inferior à 50% em quase todos os grupos, sugerindo uma maior susceptibilidade das células MB49 à DOX.

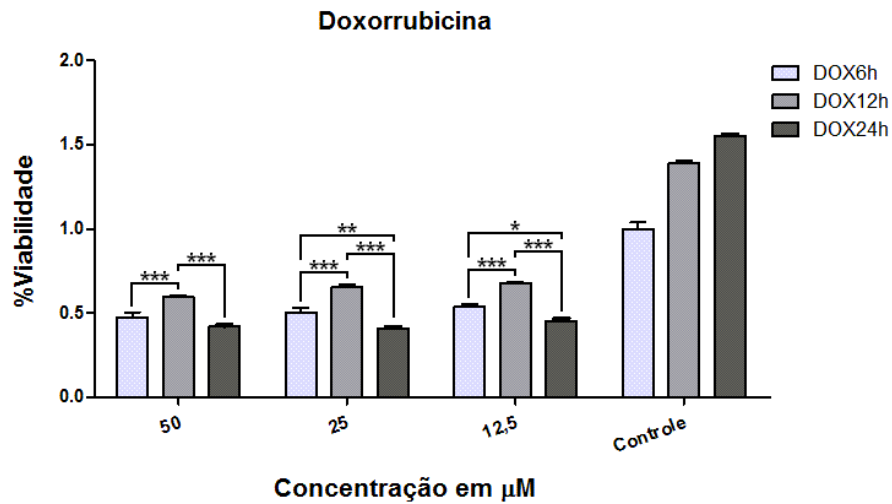


Figura 10: Citotoxicidade da doxorubicina em relação ao tempo de exposição. As células foram expostas a três diferentes concentrações de doxorubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados permitiu verificar que o grupo DOX12h apresentou viabilidade superior aos dois outros grupos. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Quando a DOX foi retirada e a quantificação da viabilidade foi realizada após as 24h sem o quimioterápico, observou-se a redução significativa da viabilidade em todos os grupos (Figura 11).

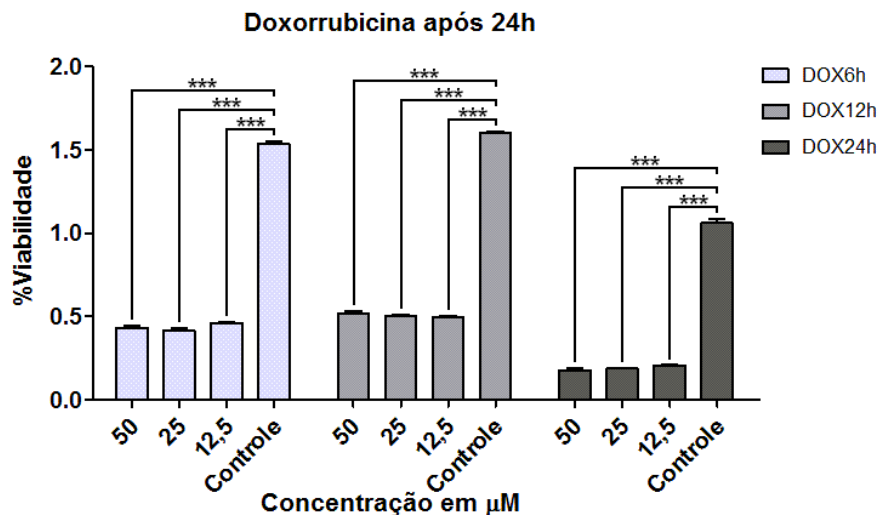


Figura 11: Citotoxicidade da doxorubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à doxorubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os dados mostraram uma redução significativa da viabilidade em todos os grupos. Os resultados representam a

média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Também observou-se que, quando comparadas em relação ao tempo de exposição, o grupo DOX24h apresentou viabilidade significativamente menor que os demais grupos. O tempo intermediário (DOX12h), apresentou viabilidade estatisticamente maior quando comparado aos dois outros grupos, exceto na concentração de 12,5 μ M (Figura 12).

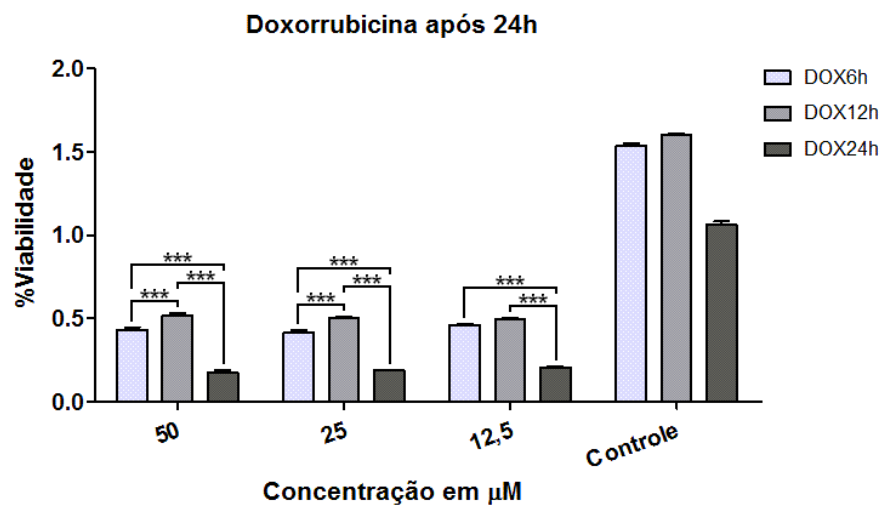


Figura 12: Citotoxicidade da doxorrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à doxorrubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os testes de viabilidade mostraram que o grupo DOX24h apresentou viabilidade significativamente menor que os demais grupos. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5.1.4. CITOTOXICIDADE DA EPIRRUBICINA

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que a EPI diminuiu significativamente a viabilidade das células MB49 em relação ao controle, comportando-se de modo dose-dependente no grupo EPI12h (Figura 13).

O mesmo ocorreu no trabalho de MAILLOUX; ADJEITEY; HARPER (2010), em que testes de viabilidade em células de leucemia promielocítica aguda multirresistente (HL-60 e MX2) mostraram a diminuição, de maneira dose-

dependente, da viabilidade dessas células após tratamento com EPI (0,05 μ M, 0,1 μ M e 0,5 μ M).

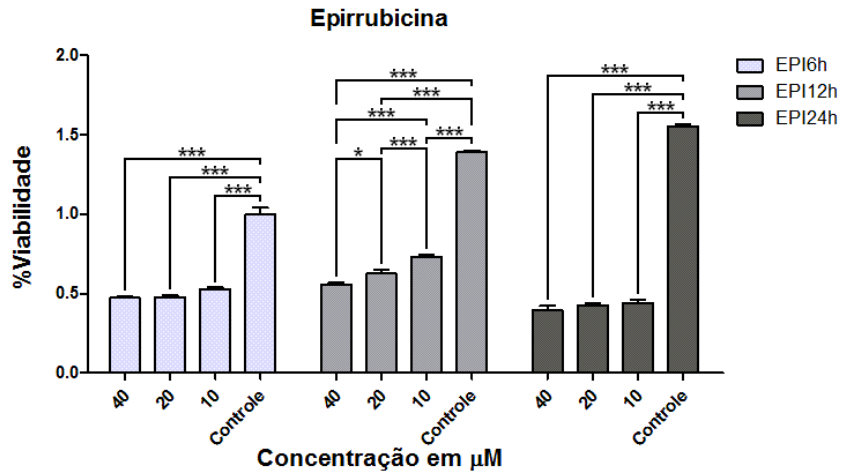


Figura 13: Citotoxicidade da epirrubicina em relação às diferentes concentrações. As células foram expostas a três diferentes concentrações de epirrubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados em relação à dose, permitiu verificar que o tratamento diminuiu significativamente a viabilidade celular, comportando-se de modo dose-dependente somente no grupo EPI12h. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em triplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

A análise da viabilidade em relação ao tempo de exposição, mostrou um significativo aumento da viabilidade no grupo EPI12h em relação aos outros dois tempos. O grupo EPI24h apresentou os menores índices de viabilidade (Figura 14).

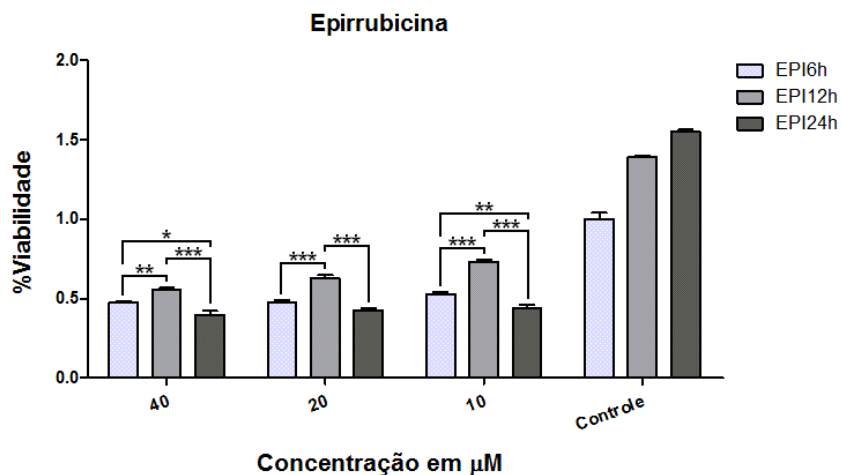


Figura 14: Citotoxicidade da epirrubicina em relação ao tempo de exposição. As células foram expostas a três diferentes concentrações de epirrubicina e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados mostrou um significativo aumento da viabilidade no grupo EPI12h em relação aos outros dois tempos. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Testes de viabilidade com células de diferentes linhagens de câncer de mama (SUM1315 e MDA-MB-231) em culturas 3D e 2D, com mais de 24h de tratamento com EPI (10 μ M) também mostraram uma diminuição da viabilidade celular (DUBOIS *et al.*, 2017).

Após a remoção da EPI e posterior quantificação da viabilidade celular, depois das 24h subsequentes ao tratamento com o quimioterápico, foi possível observar mesmo padrão dose-dependente apenas no grupo EPI12h. Não foi possível determinar um perfil de resposta ao tratamento nos dois outros grupos (EPI6h e EPI24h) (Figura 15).

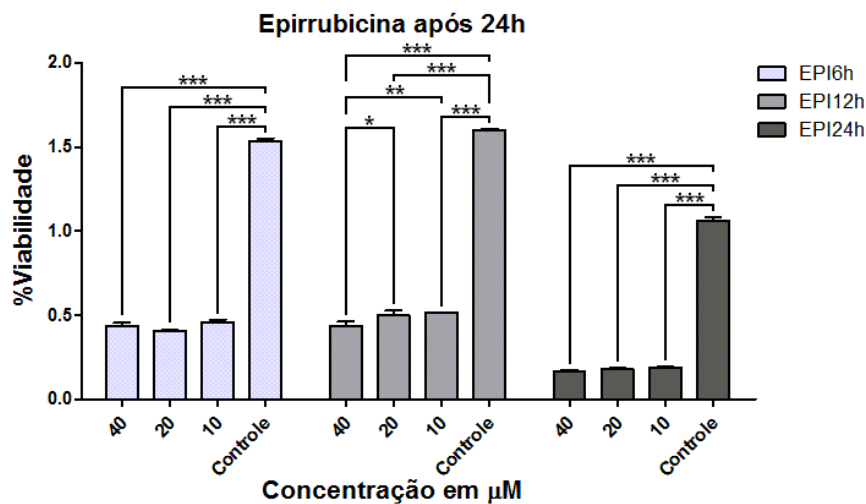


Figura 15: Citotoxicidade da epirrubicina em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à epirrubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os dados dos testes de viabilidade mostraramo mesmo perfil dose-dependente no grupo EPI12h. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Em relação ao tempo de exposição, o grupo EPI24h apresentou viabilidade significativamente menor quando comparado aos outros dois grupos em todas as concentrações (Figura 16).

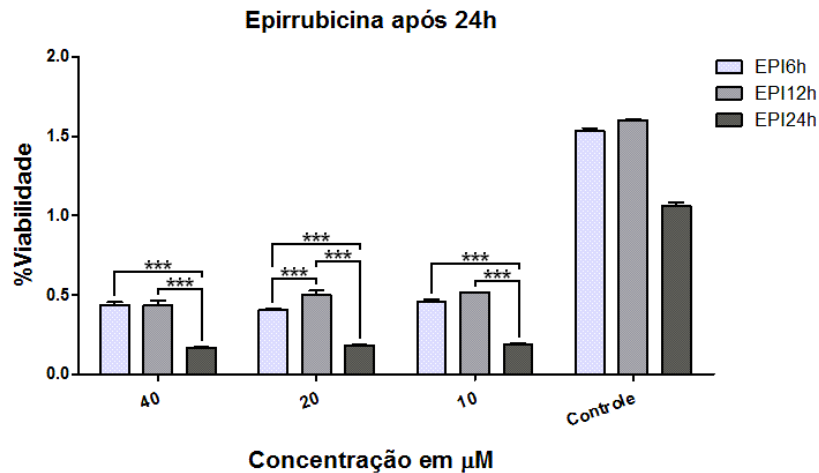


Figura 16: Citotoxicidade da epirrubicina em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à epirrubicina e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. Os testes de viabilidade mostraram que o grupo EPI24h apresentou viabilidade significativamente inferior aos outros dois grupos, em todas as concentrações. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5.1.5. CITOTOXICIDADE DA MITOXANTRONA

A MTX tem sido estudada como agente citotóxico contra diversos tipos de tumores malignos, possuindo em muitos casos, maior toxicidade quando comparada à DOX e à DAU (KOELLER; EBLE, 1988).

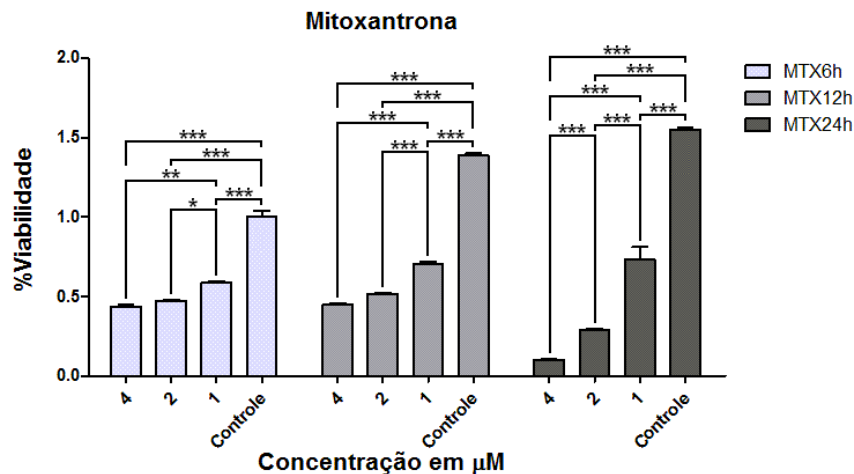


Figura 17: Citotoxicidade da mitoxantrona em relação às diferentes concentrações. As células foram expostas a três diferentes concentrações de mitoxantrona e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico, demonstrando um perfil dose-dependente. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Na Figura 17, verifica-se que a MTX diminui significativamente a viabilidade das células MB49 de modo dose-dependente, exceto entre as concentrações de 4 µM e 2 µM nos grupos MTX6h e MTX12h. NESHER *et al.* (2018) também demonstraram o perfil dose-dependente da citotoxicidade da MTX (0,01 µM até 2,5 µM), em células de carcinoma colorretal humano (HCT116), câncer de mama (MCF7) e em células HeLa.

Quando comparados em relação ao tempo de exposição, observou-se que o grupo MTX24h apresentou viabilidade significativamente menor em relação aos outros grupos, exceto na concentração de 1 µM, em que apresentou viabilidade superior aos demais grupos. Deste modo, na concentração de 1 µM, verifica-se um comportamento tempo-dependente, no qual a viabilidade aumentou conforme o aumento do tempo de exposição (Figura 18).

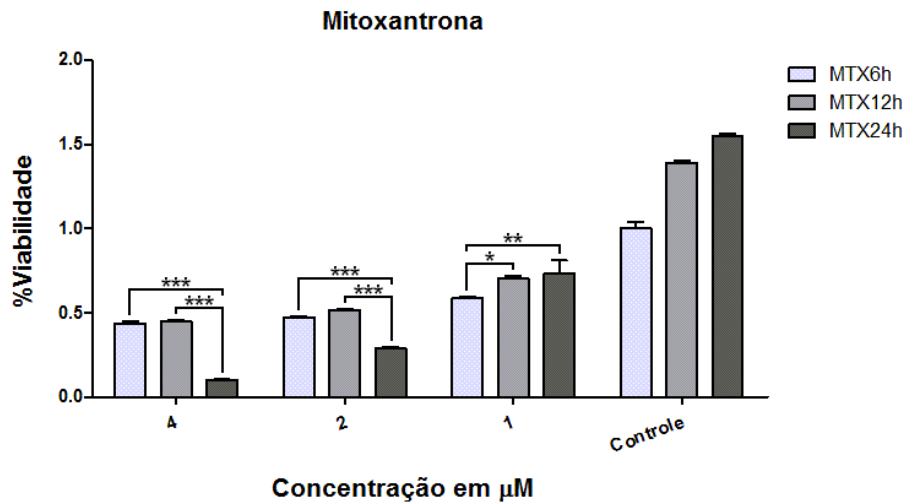


Figura 18: Citotoxicidade da mitoxantrona em relação ao tempo de exposição. As células foram expostas a três diferentes concentrações de mitoxantrona e a viabilidade foi quantificada por ensaio colorimétrico. A comparação dos dados mostra que, em uma concentração de $1\mu\text{M}$, verifica-se um comportamento tempo-dependente, no qual a viabilidade aumentou conforme o aumento do tempo de exposição. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em triplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Quando comparou-se a viabilidade das mesmas células após as 24h subsequentes à retirada do medicamento, as células continuaram a se comportar de modo dose-dependente, de maneira significativa, exceto entre as maiores concentrações ($4\mu\text{M}$ e $2\mu\text{M}$) nos grupos MTX12h e MTX24h. No grupo MTX24h observa-se ainda que nas doses mais altas ($4\mu\text{M}$ e $2\mu\text{M}$) foi obtido 0% de viabilidade (Figura 19).

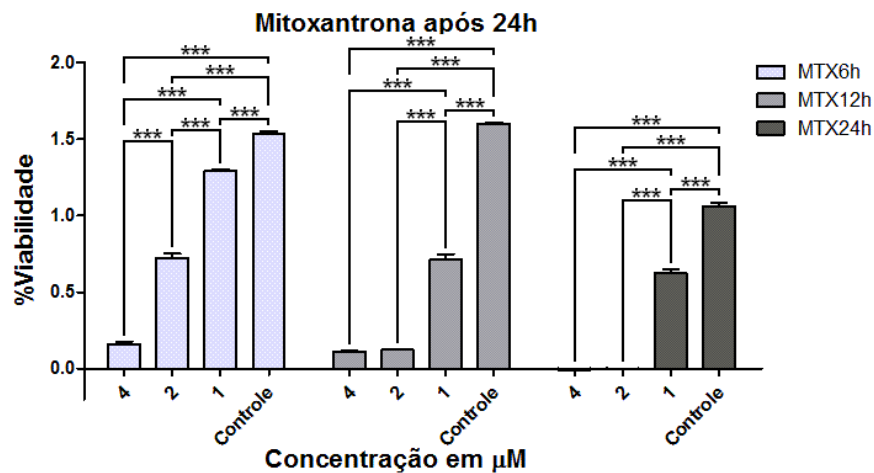


Figura 19: Citotoxicidade da mitoxantrona em relação às diferentes concentrações, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à mitoxantrona e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. O teste de viabilidade mostrou que as células mantiveram o perfil dose-dependente. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

No entanto, quando comparadas em relação ao tempo, todas as concentrações passaram a se comportar de modo tempo-dependente (Figura 20).

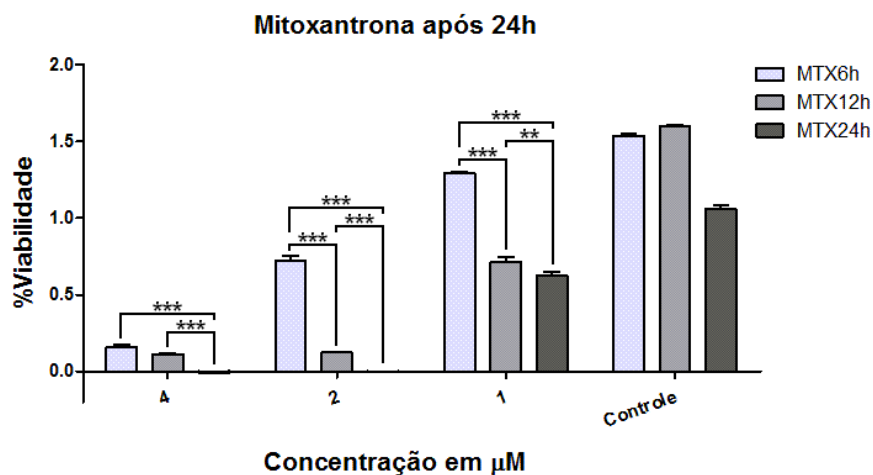


Figura 20: Citotoxicidade da mitoxantrona em relação ao tempo de exposição, após 24h da retirada do quimioterápico. Após a exposição dos grupos tratados à mitoxantrona e a remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h, em que as células passaram a se comportar de maneira tempo-dependente após esse período. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

5.1.6. VIABILIDADE CICLO CELULAR

Para quase todos os grupos testados, o aumento da viabilidade nos tratamentos por 12 horas sugere que a citotoxicidade dos quimioterápicos está diretamente relacionada com a fase do ciclo celular em que se encontram as células. Este resultado corrobora como estudo de MUELLER *et al.* (2006), em que a mesma relação foi observada em células tumorais germinativas de testículo tratadas com CPT (0,5µM a 50µM), apresentando maior sensibilidade na fase G2/M do ciclo celular.

5.1.7. VIABILIDADE APÓS A REMOÇÃO DOS TRATAMENTOS

Normalmente, os trabalhos que medem viabilidade celular não acompanham a evolução das células após a remoção dos tratamentos. Porém, foi demonstrado neste trabalho que as células passaram a se comportar de forma inesperada após as 24h subsequentes à retirada do quimioterápico, destacando assim a importância da análise de viabilidade após a retirada do tratamento utilizado.

Como pode ser observado na Figura 21, todos os grupos tratados com CPT apresentaram uma redução significante após as 24h subsequentes à retirada dos quimioterápicos, exceto na menor concentração (25 μ M) com o menor tempo de exposição à droga (CPT6h), em que a viabilidade foi significamente maior após esse período.

Para os grupos tratados com DAU, foi observada uma redução da viabilidade nos grupos que receberam a maior dose (2 μ M). Na concentração intermediária (1 μ M) houve redução apenas no grupo DAU12h. Na menor concentração (0,5 μ M), apenas no menor tempo (DAU6h) ocorreu o aumento da viabilidade (Figura 21).

Com o tratamento utilizando DOX, todos os grupos apresentaram uma diminuição siginificante da viabilidade celular após as 24h subsequentes à retirada dos quimioterápicos, exceto na maior concentração (50 μ M) no grupo DOX6h. O mesmo ocorreu no tratamento utilizando EPI, em que todos os grupos apresentaram uma diminuição siginificante da viabilidade, exceto na maior concentração (40 μ M) no grupo EPI6h (Figura 21).

Com relação aos tratamentos utilizando MTX, foi observada a redução da viabilidade de forma siginificante para todos os grupos, com exceção dos grupos MTX6h nas menores doses (2 μ M e 1 μ M), em que houve um aumento siginificante da viabilidade, e na concentração de 1 μ M no grupo MTX12h, em que não houve diferença estatística (Figura 21).

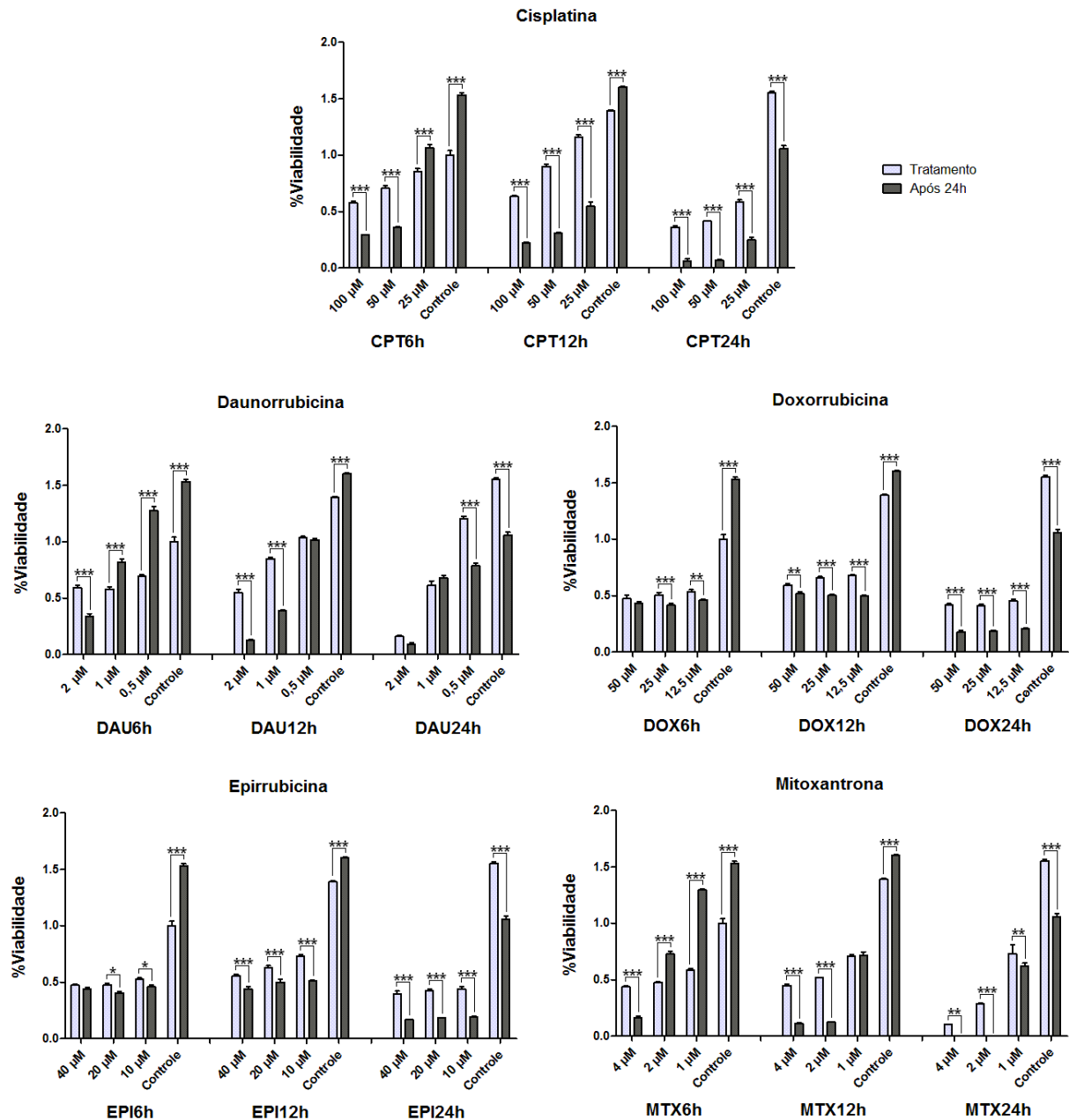


Figura 21: Viabilidade celular após as 24h subsequentes à retirada dos quimioterápicos. Após a exposição a cada quimioterápico e a posterior remoção do tratamento, as células retornaram à estufa por mais 24h. O gráfico mostra a comparação entre os resultados dos testes de viabilidade após cada tempo de tratamento (6h, 12h e 24h) com os resultados após as 24h da remoção destes tratamentos. Os resultados representam a média \pm DP de experimentos realizados em quadruplicata. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

5.2. DISCRIMINAÇÃO DE MORTE CELULAR DAS CÉLULAS MB4a9 *IN VITRO*

HELM *et al.* (2017) provaram que é possível discriminar tipo de morte celular

com simples ensaio de viabilidade, essa técnica consiste em criar duas curvas de concentração em dois tempos distintos, sendo um ensaio nos primeiros momentos em que o composto usado como tratamento começa a interferir na viabilidade e outro ensaio mais adiante no qual a viabilidade das células já sofreram grandes alterações. E assim, ao fazer a diferença entre os pontos da curva do primeiro ensaio de viabilidade e os pontos do segundo ensaio, é gerada uma curva, cujo ocorresponde ao ponto de maior apoptose.

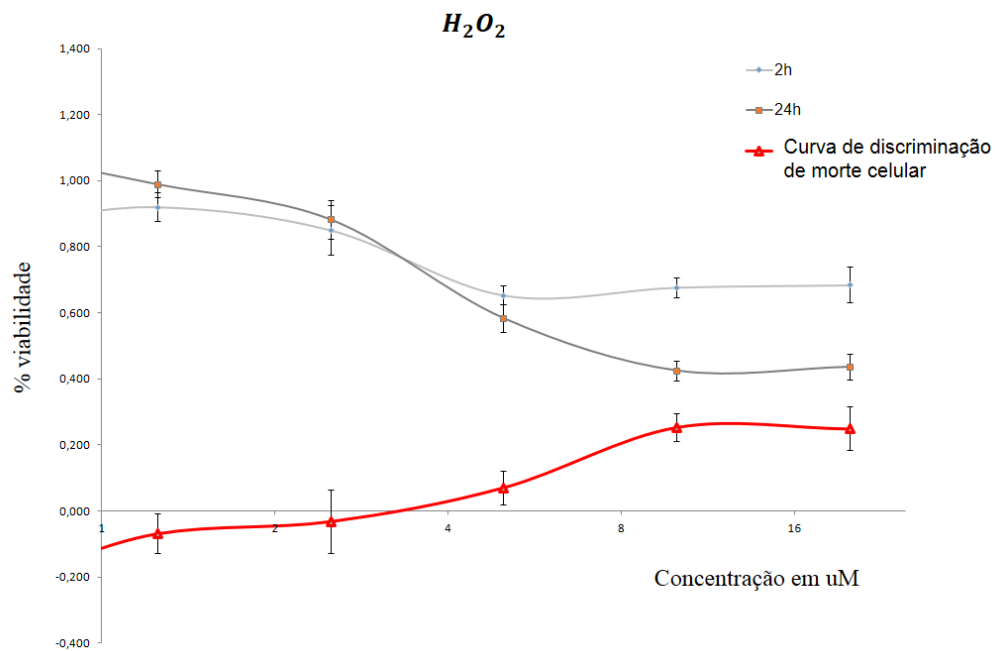


Figura 22: Controle positivo de apoptose. Foi utilizado uma curva dose-resposta de H_2O_2 como controle positivo de apoptose a partir da diferença entre os pontos de viabilidade de 2h e 24h, gerando um pico de apoptose na concentração de $10\mu M$.

RATHINAM *et al.* (2015) mostraram que linhagens de células auditivas, renais e neuronais (UBOC1, HK2 e SH-SY5Y), apresentaram expressão aumentada para caspase-3, um biomarcador de apoptose, após 24h de tratamento com CPT (5, 10 e $20\mu M$). Na Figura 11, podemos verificar que a CPT foi capaz de provocar um pico de apoptose nas células MB49 em uma concentração de $25\mu M$. Diferentes linhagens de células quando tratadas com CPT podem apresentar expressão aumentada para biomarcadores de apoptose, como mostra o trabalho de PRICE *et al.* (2006), no qual análises por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência também confirmaram

que a administração de CPT a 25 μ M, em células TKPTS de rim murino, promove apoptose após 24h de tratamento.

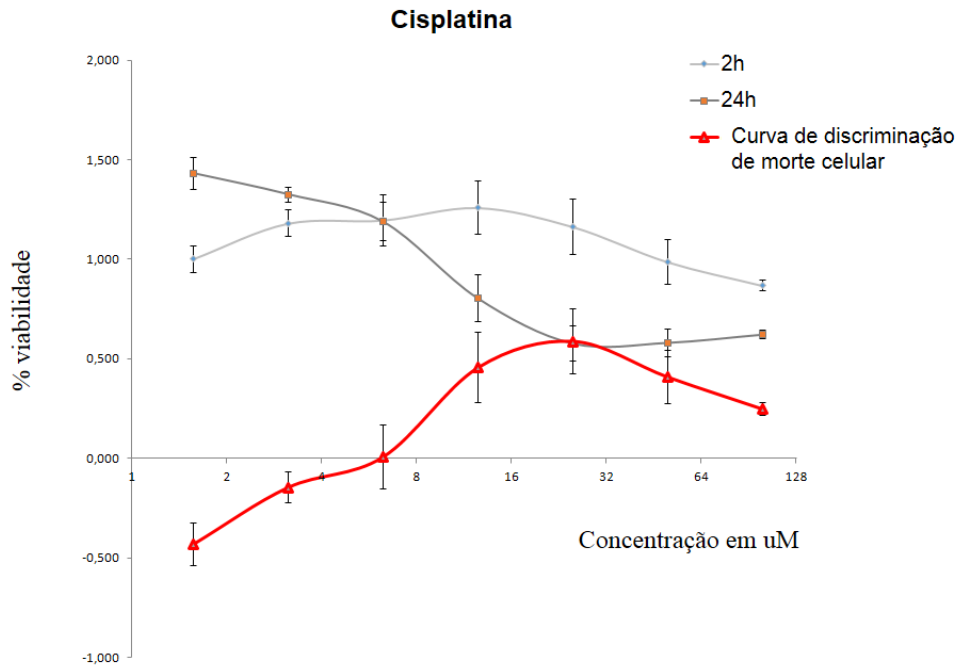


Figura 23: Curva de discriminação de morte das células MB49 após tratamento com cisplatina. Observa-se um pico de apoptose na concentração de 25 μ M.

Como já discutido anteriormente, observa-se na Figura 13 um pico de apoptose provocada pela CPT no gráfico (A) em uma concentração de 25 μ M. Além disso, no gráfico (C), também é possível verificar um pico de apoptose na concentração de 2 μ M com MTX, corroborando com o trabalho de KOCEVA-CHYLA *et al.*, 2005 em que demonstraram a promoção de apoptose após aplicação de MTX (0,5, 1 e 2 μ M) com 24, 48 e 72h de tratamento, onde a porcentagem máxima de apoptose (aproximadamente 62%) foi obtida no tratamento com 2 μ M e 72h.

Enquanto que a DAU e a DOX, gráfico (B) e (D) respectivamente da Figura 12 não foram capazes de gerarem um pico de apoptose nas concentrações utilizadas, apenas mostraram uma tendência de formação de curva, porém não o suficiente para determinar seus ápices, sendo assim necessário novos ensaios com outras concentrações.

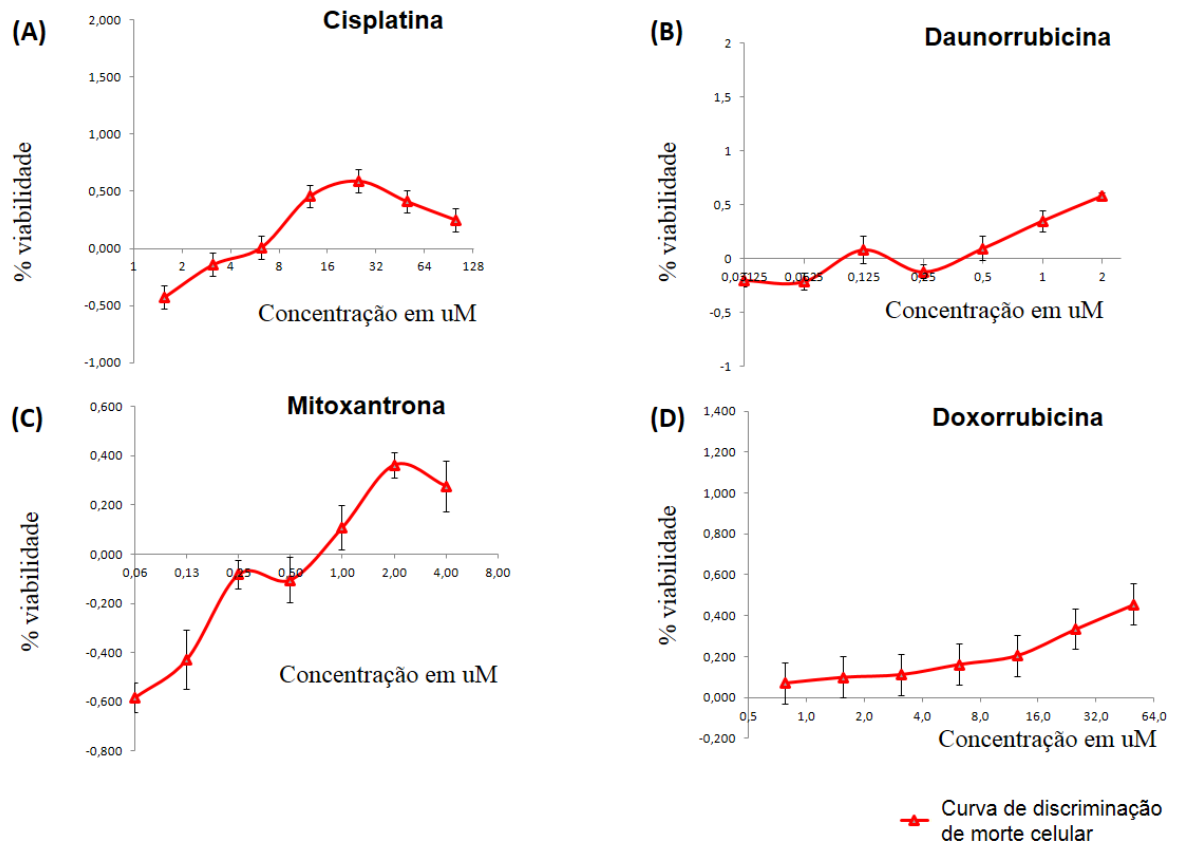


Figura 24: Curva de discriminação de morte das células MB49. (A) tratadas com cisplatina; (B) tratadas com daunorrubicina; (C) tratadas com mitoxantrona e (D) tratadas com doxorubicina.

6. CONCLUSÃO

Os quimioterápicos em sua formulação farmacêutica produziram graus variados de morte dependendo da dose e do tempo contra as células MB49 *in vitro*. Além disso, evidenciou-se a necessidade de um acompanhamento da viabilidade após a remoção dos tratamentos. A cisplatina e a mitoxantrona mostraram-se eficientes em produzir apoptose, porém somente testes *in vivo* poderão confirmar seu efeito imunogênico sobre essas células.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. Jr.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods.*, v.170, n. 2, p. 211-24, apr/1994.
- AN, G.; MORRIS, M. E. A physiologically based pharmacokinetic model of mitoxantrone in mice and scale-up to humans: a semi-mechanistic model incorporating DNA and protein binding. *The AAPS Journal*, Arlington, v.14, n. 2, p. 352-64, jun/2012.
- ANDRADE, P. M. *et al.* The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v. 28, n. 5, p. 520–25, sep-oct/2010.
- ANTONI, S. *et al.* Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends. *European Urology*, v. 71, n. 1, p. 96–108, jan/2017.
- ARAMVASH, A.; CHADEGANI, A. R.; LOTFI, S. Evaluation of apoptosis in multipotent hematopoietic cells of bone marrow by anthracycline antibiotics. *Iran J Pharm Res.*, v. 16, n. 3, p. 1204-13, jun/2017.
- ARNOLD, T. *et al.* Plasma HMGB-1 after the initial dose of epirubicin/docetaxel in cancer. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 43, n. 3, p. 286-91, mar/2013.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA Projeto diretrizes. Câncer de bexiga, Parte 1 e Parte 2. Disponível em: projetodiretrizes.org.br/6_volume/06-Cancerbexigal.pdf e rojetodiretrizes.org.br/6_volume/07-Cancerbexiga2.pdf. 2006
- AU, W. W. *et al.* Comparative structure-genotoxicity study of three aminoanthraquinone drugs and doxorubicin. *Cancer Research*, v. 41, n. 2, p. 376-79, fev/1981.

- AVRITSCHER, E. B. C. *et al.* Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology*, v. 68, n. 3, p. 549–53, sep/2006.
- BABJUK, M. *et al.* Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta,T1 and CIS) European Association of Urology, v. 59, n. 4, p. 584-94, apr/2009.
- BERAL, V.; NEWTON, R. Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr.* v. 1998, n. 23, p. 1-6. 1998.
- BINASCHI, M. *et al.* Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, v. 1, n. 2, p. 113-30, aug/2001.
- BONFANTE, V.; VILLANI, F.; BONADONNA, G. Toxic and therapeutic activity of 4'-epi-doxorubicin. *Tumori*, v. 68, n. 2, p. 105-11, 1982.
- BONFANTE, V. *et al.* Preliminary clinical experience with 4-epidoxorubicin in advanced human neoplasia. *Recent Results in Cancer Research*, v. 74, p. 99-192, 1980.
- BONNIER, F. *et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models, *Toxicology in Vitro*, v. 29, n. 1, p. 124-31, feb/2015.
- BORRA, R. C. *et al.* A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, v. 23, n. 3, p. 255-62, jul-sep/2009.
- 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, feb/2000.
- BURGER, M. *et al.* Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology*, v. 63, n. 2, p. 234–41, feb/2013.
- CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw Hill. 10^o ed. Rio de Janeiro, p. 1035-9, 1997.

- CANCER AGENCY. Cancer Drug Manual 2006. Disponível em <http://www.bccancer.bc.ca/health-professionals/clinical-resources/cancer-drug-manual>. Acesso em: 20-06-2018.
- CHOU, R.; DANA, T. Screening adults for bladder cancer: A review of the evidence for the U.S. preventive services task force. *Ann Intern Med*, v.153, n. 7, p. 461-68, oct/2010.
- CHUGUN, A. *et al.* Mechanisms responsible for reduced cardiotoxicity of mitoxantrone compared to doxorubicin examined in isolated Guinea-pig heart preparations. *J. Vet. Med. Sci*, v. 70, n. 3, p. 255-64, mar/2008.
- DAVIES, M. S.; BERNERS-PRICE, S. J.; HAMBLEY, T. W. Rates of platination of -AG- and -GA- containing double-stranded oligonucleotides: effect of cholate concentration. *J. Inorg. Biochem.*, v. 79, p. 167-172, 2000.
- DAHM, P.; GSCHWEND, J. E. Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder : A review. v. 44, n. 6, p. 672–81, dec/2003.
- DEN BOER, M. L. *et al.* Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, v. 13, n. 12, p. 2023-30, dec/1999.
- DIAS, V. M. *et al.* O grau de interferência dos sintomas gastrintestinais no estado nutricional do paciente com câncer em tratamento quimioterápico. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 104-10, abr-mai-jun/2006.
- DIBB, M. J. *et al.* Ultrasonographic analysis of bladder tumors. *Clin.Imaging*; v. 25, n. 6, p. 416-20, nov-dec/2001.
- DUBOIS, C. *et al.* Development and cytotoxic response of two proliferative MDAMB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget*, v. 8, n. 56, p. 95316-31, aug/ 2017.

- DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. v. 24, n. 2, p. 137-48, aug/2004.
- EBLE, J. N. *et al.* Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours, p. 354, 2004.
- ENGELS, E. A. *et al.* Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer*. v. 123, n. 1, p. 187-94, jul/2008.
- EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 342-8, may/2001.
- EVELYNE, C. C.; de la ROSETTE, J. J.; de REIJKE, T. M. Emerging optical techniques in advanced cystoscopy for bladder cancer diagnosis: A review of the current literature. *Indian Journal of Urology*, v. 27, n. 2, p. 245-51, april/2011.
- FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-86, mar/2015.
- FERRARI, C. L. S.; HERZBERG, V. Tenho câncer. E agora? Enfrentando o câncer sem medos ou fantasias. São Paulo. 1997.
- FISHER, G. R.; PATTERSON, L. H. DNA strand breakage by peroxidase-activated mitoxantrone. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 43, n. 1, p. 65-8, jan/1991.
- FLEZAR, M. S. Urine and bladder washing cytology for detection of urothelial carcinoma: standard test with new possibilities. *Radiology and oncology*, v. 44, n. 4, p. 207-14, dec/2010.
- FRIDMAN, W. H. *et al.* The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. v. 12, n. 4, p.298-306, mar/2012.

- GALLUZZI, L. *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*; v. 14, n. 7, p. 1237-43, jul/2007.
- GALSKY, D. M.; HALL, S. J. Bladder cancer: current management and opportunities for a personalized approach. *Mount Sinai Journal of Medicine*, v.77, n. 6, p. 587-96, nov-dec/ 2010.
- GANZINA, F. 4'-epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data. *Cancer Treat Rev.*; v. 10, n. 1, p. 1-22, mar/1983.
- GEOGHEGAN F. *et al.* Bioenergetics of acquired cisplatin resistant H1299 non-small cell lung cancer and P31 mesothelioma cells. *OncoTarget*, v. 8, n.55, p. 94711-25, nov/2017.
- GONZALEZ, E. R. *et al.* Bladder carcinoma data with clinical risk factors and molecular markers: a cluster analysis. *BioMed Research International*, v. 2015 p. 1-14, jan/2015.
- GREEN D. R. *et al.* Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* v. 9, n. 5, p. 353, may/2009.
- GRIMM, M. O. *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. 433–37, aug/2003.
- HALABE, A.; WONG, N. L. M.; STTON, R. A. L. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. *Nephronology*, v. 57, p. 197-200, 1991.
- HAMID, R. *et al.* Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicology In Vitro*, v. 18, n. 5, p. 703-10, oct/2004.
- HAN, J. Y. *et al.* The relationship between cisplatin-induced apoptosis and p53, bcl-2 and bax expression in human lung cancer cells. *The Korean Journal of Internal Medicine*, v. 14, n. 1, p. 42-52, jan/1999.

- HELM, K. *et al.* In Vitro Cell Death Discrimination and Screening Method by Simple and CostEffective Viability Analysis. *Cell Physiol Biochem.*, v. 41, n. 3, p. 1011-19, feb/2017.
- HENEY, N. M. *et al.* Intravesical thiotepa versus mitomycin C in patients with Ta, T1 and Tis transitional cell carcinoma of the bladder: a phase III prospective randomized study. *J Urol*, v. 140, n. 6, p. 1390-3, dec/1988.
- 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. 74–6, jul/1999.
- HOFMAN, F. M. *et al.* Immunotherapy of malignant gliomas using autologous and allogeneic tissue cells. *Anticancer Agents Med Chem*; v. 10, n. 6, p. 462-70, jul/2010.
- INOUE, S., SETOYAMA, Y., ADAKA, A. Doxorubicin treatment induces tumor cell death followed by immunomodulation in a murine neuroblastoma model. *Experimental and Therapeutic Medicine*; v. 7, n. 3, p. 703-8, mar/2014.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. (INCA) Incidência de Câncer no Brasil: Estimativa 2014. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa 2014.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. (INCA) Incidência de Câncer no Brasil: Estimativa 2016. Rio de Janeiro: ISBN 978-85-7318-283-5. 2015
- JONES T. W. *et al.* Cis-diamminedichloroplatinum(II) induced renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations. *Lab Invest.* v. 52, n. 4, p.363-74, apr/1985.
- JONES, J. L.; COLES, A. New treatment strategies in multiple sclerosis. *Experimental Neurology*, v. 225, n. 1, p. 34-9, sep/2010.
- KALENDER, Y.; YEL, M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology*; v. 209, n. 1, p. 39-45, apr/2005.

- KEPP, O. *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Onco immunology*; v. 3, n. 9, p. 1-21, dec/2014.
- KIRKALI, Z. *et al.* Bladder cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, v. 66, n. 6 SUPPL. 1, p. 4–34, dec/2005.
- KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. Molecular biology of bladder cancer : new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Ver Cancer*, v. 15, n. 1, p. 25–41, jan/2015.
- KOCEVA-CHYLA, A. *et al.* Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis.*, v. 10, n. 6, p. 1497-514, dec/2005.
- KOELLER, J.; EBLE, M. Mitoxantrone: a novel anthracycline derivative. *Clin Pharm.*, v. 7, n. 8, p. 574–81, aug/1988.
- KROEMER, G. *et al.* Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* v. 31, p.51-72, mar/2013.
- KRYSKO, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2012; v. 12, n. 12, p. 860-75, dec/2012.
- LAMM, D. L. Bladder Cancer: Twenty years of progress and challenges that remain. *CA Cancer J Clin.*, v. 48, n. 5, p. 263-8, set-out/1998.
- LETASIOVÁ, S. *et al.* Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environmental Health*, v.11 (Suppl 1), jun/2012.
- LOSKOG, A. *et al.* Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy. *Laboratory animals*, v. 39, n. 4, p. 384–93, oct/2005.
- LOTFI, K.; ZACKRISSON, A. L.; PETERSON, C. Comparison of idarubicin and daunorubicin regarding intracellular uptake, induction of apoptosis, and resistance. *Cancer Lett.*, v. 178, n. 2, p. 141-9, apr/2002.

- MAILLOUX, R. J.; ADJEITEY, C. N-K.; HARPER, M-E. Genipin-Induced Inhibition of Uncoupling Protein-2 Sensitizes Drug-Resistant Cancer Cells to Cytotoxic Agents. PLoS ONE, v. 5, n. 10, p. 1-10, oct/2010.
- MELIS, M. H. *et al.* Sustained tumour eradication after induced caspase-3 activation and synchronous tumour apoptosis requires an intact host immune response. Cell Death Differ. v. 20, n. 5, p. 765-73, may/2013.
- MINOTTI, G. *et al.* Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological Reviews, v. 56, n. 2, p. 185-229, jun/2004.
- MORRISEY, S. P.; LE PAGE, E.; EDAN, G. Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. The Internacional Multiple Sclerosis Journal. Worthing, v. 12, n. 3, p. 74-87, nov/2005.
- MUELLER, S. *et al.* Cell-cycle progression and responde of germ cell tumors to cisplatin *in vitro*. Int J Oncol, v. 29, n. 2, p. 471-9, aug/2006.
- MUNGAN, N. A.; WITJES, J. A. Bacille Calmette-Guerin in superficial transitional cell carcinoma. Br J Urol.; v. 82, n. 2, p.213-23, aug/1998.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Bladder Cancer - Patient Version. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/bladder>>. Acesso em: fev/2018.
- NESHER, E. *et al.* Role of chromatin damage and chromatin trapping of FACT in mediating the anticancer cytotoxicity of DNA-binding small molecule drugs. Cancer Res., v. 78, n. 6, p. 1431-43, jan/2018.
- NETO, M. C. Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia 2013. 1ª Ed. São Paulo, Hospital Albert Einstein. 2013
- NEUHAUS, O.; KIESEIER, B. C.; HARTUNG, H. P; Mechanisms of mitoxantrone in multiple sclerosis: what is known? Journal of Neurological Sciences, v. 223, n. 1, p. 25-7, aug/2015.

- OBEID, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.*; v. 13, n. 1, p. 54-61, jan/2007.
- O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.*, v. 267, n. 17, p. 5421-6, sep/2000.
- OSANTO, S. *et al.* Increased frequency of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes up to nine years following curative chemotherapy of patients with testicular carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 17, p. 71-78, 1991.
- PARMAR, M. K. B. *et al.* Prognostic factors for recurrence and follow-up policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the british medical research council sub group on superficial bladder cancer (urological cancer working party). *The Journal of Urology*, p. 284-88, 1989.
- PELFREY, C. M. Immunological studies of mitoxantrone in primary progressive MS. *Journal of Neuroimmunology*, v. 175, n. 1-2, p. 192-9, jun/2006.
- PERICOT, I.; MONTALBAN, X. Mitoxantrona. *Neurología*, v. 18, n. 6, p. 318-23, julio/2003.
- POMMIER, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol.*; v. 8, n. 1, p. 82-95, jan/2013.
- PRICE, P. M. *et al.* Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *J Am Soc Nephrol.*, v. 17, n. 9, p. 2434-42, sep/2006.
- RATHINAM, R. *et al.* Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. *Cell Death Discovery*. pii: 15052, nov/2015.
- ROLÓN, M. *et al.* Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.*, v. 99, n. 2, p. 103-7, jul/ 2006.

- ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer*, v. 55, n. 10, p. 2303-16, may/1985.
- ROSSATO, L. G. *et al.* Mitochondrial cumulative damage induced by mitoxantrone: late onset cardiac energetic impairment. *Cadiovasc Toxol.*; v. 14, n. 1, p. 30-40, mar/ 2014a.
- ROSSATO, L. G. *et al.* Cumulative mitoxantrone-induced haematological and hepatic adverse effects in a subchronic in vivo study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*; v. 114, n. 3, p. 254-62, mar/2014b.
- SAFA, A. R; TSENG, M. T. Inhibition of protein synthesis and cell proliferation in cultured human breast cancer cells treated with mitoxantrone. *Cancer Lett* v. 24, n. 3, p. 317-26, oct/1984.
- SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*, v. 18, n. 6, p.379-96. 2004.
- SCHULTZ, L. *et al.* Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. *Wiley OnlineLibrary*, v. 116, n. 23, p. 5517-26, dec/2010.
- SHARIAT, S. F.; MILOWSKY, M.; DROLLER, M. J. Bladder cancer in the elderly, *Urol. Oncol.*; v. 27, n. 6, p. 653-77, nov-dec/2009.
- SHERR, C. J. Cancer cell cycles. *Science*; v. 274, n. 5293, p. 1672-7, dec/1996.
- SIEGEL, R. *et al.* Cancer Statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 64, n. 5, p. 364, sep-oct/2014.
- SIEVERT, K. D. *et al.* Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World journal of urology*, v. 27, n. 3, p. 295–300, jun/2009.
- SMITH, L. A. *et al.* Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*; v. 10, n. 337, p. 1471-2407, jun/2010.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA e SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. Projeto Diretrizes: Câncer de Bexiga – Diagnóstico. Rev Assoc Med Bras, v. 54, n. 2, p.95-104. 2008.
- STARNES, C.O. Coley's toxins in perspective. Nature; v. 357, n. 6373, p. 11–12, may/1992.
- SUKKURWALA, A. Q. *et al.* Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set. Oncoimmunology; v. 3, p. 1-10, apr/2014.
- SUN, W. L. *et al.* Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. Journal Autophagy, v. 7, n. 9, p. 1035-44, sep/2011.
- TANAKA, T. *et al.* Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. Journal of Oncology, v. 2011, p. 1-23, jul/2011.
- TORTI, F. M. *et al.* Cardiotoxicity of epirubicin and doxorubicin: assessment by endomyocardial biopsy. Cancer Res.; v. 46, n. 7, p. 3722-727, jul/1986.
- TOSCAN, C. E. *et al.* High-throughput screening of human leukemia xenografts to identify dexamethasone sensitizers. J. Biomol. Screen., v. 19, n. 10, p. 1391-401, dec/2014.
- VISHNU, P.; MATHEW, J.; TAN, W. Current therapeutic strategies for invasive and metastatic bladder cancer. Onco Targets and Therapy, v. 2011, n. 4, p. 97-113, jul/2011.
- ZHOU, S. Y.; PALMEIRA, C. M.; WALLACE, K. B. Doxorubicin-induced persistente oxidative stress to cardiac myocytes. Toxicology Letters. v. 121, n. 3, p. 151-57, may/2001.
- ZITVOGEL, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. Nat. Rev. Clin. Oncol. v. 8, n. 3, p. 151–60, mar/2011.

- WHITE, R. J.; DURR, F. E. Development of mitoxantrone. *Invest New Drugs*, v.3, n. 2, p. 85-93, 1985.
- WITJES, J. A. *et al.* Muscle-invasive and metastatic bladder cancer. *European Association of Urology*, v. 65, n. 4, p. 778-92, apr/2014.
- WU, H. *et al.* Association between N-acetyltransferase 2 polymorphism and bladder cancer risk: results from studies of the past decade and a meta-analysis (Review). *Clinical Genitourinary Cancer*, v. 14, n. 2, p. 122-29, apr/2016.
- YANG, D.; WANG, A. H. J. Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 66, p. 81-111, 1996.
- 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. 1093–104, nov/2014.