



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



COMPORTAMENTO MATERNO E CÂNCER DE BEXIGA
URINÁRIA: IMPLICAÇÕES DA MODULAÇÃO DE EIXOS
HORMONAIS E RECEPTORES DE ESTEROIDES NA
FISIOPATOLOGIA DE LESÕES NEOPLÁSICAS

LUIZ ANTONIO LUPI JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior

**BOTUCATU – SP
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

COMPORTAMENTO MATERNO E CÂNCER DE BEXIGA
URINÁRIA: IMPLICAÇÕES DA MODULAÇÃO DE EIXOS
HORMONAIS E RECEPTORES DE ESTEROIDES NA
FISIOPATOLOGIA DE LESÕES NEOPLÁSICAS

LUIZ ANTONIO LUPI JÚNIOR

PROF DR. WÍLSON DE MELLO JÚNIOR

PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lupi Júnior, Luiz Antonio.

Comportamento materno e câncer de bexiga urinária :
implicações da modulação de eixos hormonais e receptores
de esteroides na fisiopatologia de lesões neoplásicas /
Luiz Antonio Lupi Júnior. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Wilson de Mello Júnior

Coorientador: Wagner José Fávaro

Capes: 20600003

1. Bexiga - Câncer. 2. Hormônios esteroidianos. 3.
Fisiopatologia. 4. Resposta imune.

Palavras-chave: Bexiga urinária; Câncer; Comportamento
materno; HHA; Receptores esteroides.

Agradecimentos

Agradeço à minha família por todo o incentivo e força prestados durante esta fase, especialmente à minha mãe Maria Cecília S. Lupi por todo o carinho, suporte, dedicação e amor prestados, à minha companheira Marcilene A. Tomazela pela paciência, compreensão e amor todos os dias e às minhas irmãs Carolina S. L. de Almeida e Camila S. L. Redondo por nunca deixarem de viver o amor de irmãos.

Agradeço especialmente ao meu filho Lorenzo T. Lupi, que em sua inocência de criança me faz acordar todos os dias e me dedicar cada vez mais em busca de um futuro melhor para nossa família.

Ao meu querido pai Luiz Antonio Lupi por todo o amor, apoio, carinho e dedicação ímpares para que um dia eu pudesse seguir meus sonhos, na tentativa de me tornar um pouco do grande homem que ele foi um dia.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao Departamento de Anatomia e todos os seus professores e assessores técnico-administrativos pela acolhida e convivência diária.

Agradeço ao Prof. Dr. Wilson de Mello Júnior por todos os anos de orientação, pelo exemplo de profissional a ser seguido e por acreditar que eu poderia chegar onde estou hoje.

Ao Prof. Dr. Wagner José Fávaro pela coorientação e suporte prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa pela parceria, pela atenção constante e pelos ensinamentos essenciais para este e outros trabalhos.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro a mim concedido e à FAPESP pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Sumário

Resumo	6
Introdução	7
Bexiga Urinária	7
Câncer de bexiga urinária	7
Receptores de esteroides e câncer de bexiga urinária	10
Comportamento materno	12
Materiais e métodos	18
Avaliação do comportamento materno	19
Formação dos grupos experimentais	20
Indução química do câncer de bexiga urinária	21
Análise histopatológica	21
Imuno-histoquímica	23
<i>Western blotting</i>	24
Análise estatística.....	25
Resultados	26
Comportamento materno	26
Análise histopatológica	26
Análise da imunorreatividade aos receptores de esteroides e à proteína p53	27
Análise dos níveis de receptores de esteroides e da proteína p53.....	27
Dosagem sérica de testosterona e 17 β -estradiol	28
Discussão	38
Referências bibliográficas	45

Resumo

O carcinoma de bexiga urinária é o tipo de câncer mais prevalente no sistema urinário em seres humanos e apresenta altos índices de morbidade e mortalidade. Seu desenvolvimento está relacionado a diversos fatores de risco, como o hábito de fumar, a exposição a agentes químicos industriais e metais pesados e o estresse crônico. As experiências adversas no início da vida estão relacionadas à modulação de eixos hormonais importantes, como o hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) e hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). Alterações na resposta do eixo HHA, componente central da resposta fisiológica ao estresse, levam a distúrbios fisiológicos, como aumento da proliferação celular, angiogênese e prejuízo da resposta imune, que podem ser responsáveis pelo aumento da susceptibilidade do indivíduo a uma série de doenças na vida adulta, incluindo o câncer. Paralelamente, alterações na fisiologia de hormônios esteroides como andrógenos, estrógenos e glicocorticoides, bem como seus receptores, também têm sido relacionadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer de bexiga urinária. Em ratos, o comportamento materno funciona como um fator importante na modulação desses eixos hormonais, modificando suas respostas na vida adulta, e estudos recentes têm relacionado os cuidados recebidos por filhotes à incidência de tumores. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do comportamento materno e sua consequente modulação nos eixos HHA e HHG, no desenvolvimento do câncer de bexiga urinária. Os resultados mostraram que ratas criadas por mães negligentes apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de bexiga urinária induzido quimicamente, pois desenvolveram lesões uroteliais mais graves quando comparadas a fêmeas que receberam cuidados maternos intensos. Também foi observado que os níveis de receptores de hormônios esteroides na bexiga urinária foram sensíveis ao tipo de cuidados recebidos. Desta forma concluímos que o comportamento materno, recebido durante o desenvolvimento pós-natal, influencia o desenvolvimento e a gravidade de tumores uroteliais induzidos quimicamente em roedores, possivelmente através da regulação de níveis hormonais e de receptores de esteroides. Novos estudos são necessários para entender essa relação complexa, principalmente para compreender se os cuidados maternos neonatais são protetores ou se a negligência materna favorece o desenvolvimento de enfermidades graves no adulto, como o carcinoma urotelial.

Introdução

Bexiga Urinária

A bexiga urinária é um órgão muscular oco responsável pelo armazenamento do produto de excreção dos rins, a urina. Em seres humanos, o órgão está localizado na cavidade pélvica e, no homem, faz relação direta com as alças do intestino delgado e o colo sigmoide superiormente, com a sínfise púbica anteriormente, com as glândulas seminais e a próstata inferiormente e com o reto, posteriormente. Na mulher, a bexiga urinária tem relação anatômica com o útero e as alças intestinais superiormente, com a vagina posteriormente, assoalho pélvico inferiormente e sínfise púbica anteriormente (DRAKE *et al.*, 2013). Em roedores, utilizados no desenvolvimento deste trabalho, localiza-se na cavidade abdominopélvica, fazendo relação com as alças intestinais em sua parte crânio-ventral e com o reto em sua parte dorso-caudal (POPESKO *et al.*, 1992).

A bexiga urinária possui três camadas de tecidos: mucosa, muscular e adventícia ou serosa, esta última conforme a região da bexiga urinária. A camada mucosa é formada por epitélio estratificado de transição, composto por 3 a 5 camadas de células uroteliais, sendo a camada superficial a mais diferenciada, formada por grandes células superficiais (células em guarda-chuva). A camada muscular é constituída por músculo liso interposto com tecido conjuntivo e é composta por duas camadas longitudinais, interna e externa, e uma camada circular entre elas. A túnica adventícia é constituída por tecido conjuntivo frouxo e contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Câncer de bexiga urinária

O câncer de bexiga urinária figura como o tipo de câncer mais prevalente no sistema urinário e apresenta altos índices de morbidade e mortalidade (SIEGEL *et al.*, 2013). Trata-se da quarta maior causa de morte em decorrência de cânceres em homens no Reino Unido, onde a

chance de um homem desenvolver essa neoplasia, em algum momento da vida, é de uma em 26 (CANCER RESEARCH UK, 2015). Nos Estados Unidos, havia para o ano de 2015, a estimativa de 74.000 novos casos e mais de 16.000 mortes em decorrência da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No último levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer, estimou-se que, em 2014, ocorreriam 8.940 novos casos de câncer de bexiga urinária (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2015).

Os tumores de bexiga urinária são divididos em duas categorias: não músculo-invasivos, mais comuns, e músculo-invasivos, menos frequentes e com baixa expectativa de vida pós-diagnóstico (KNOWLES & HURST, 2015). Segundo postulado pela Organização Mundial da Saúde, as alterações superficiais (não invasivas) da bexiga urinária são classificadas em: hiperplasia plana, hiperplasia papilífera, neoplasia intraurotelial de baixo grau, neoplasia intraurotelial de alto grau - carcinoma *in situ* (pTis), carcinoma urotelial papilífero (pTa) de baixo grau, carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau e carcinoma invasivo da lâmina própria (pT1) (MIYAMOTO *et al.*, 2010). O estadiamento do câncer de bexiga urinária refere-se à quão profunda é a invasão das células neoplásicas no tecido da bexiga urinária, enquanto a graduação dos tumores refere-se ao nível de alterações celulares presentes no exame microscópico (LOKESHWAR *et al.*, 2011). Mais de 70% dos tumores da bexiga urinária são superficiais e 50% deles recorrem após quatro anos de tratamento, sendo que 11% progridem para tumores músculo-invasivos (SHIMADA *et al.*, 2011). Os índices de recorrência dos tumores uroteliais são altos, entre 50% e 90% dos casos dependendo do estágio, grau e número de tumores primários, exigindo acompanhamento de sua evolução pelo resto da vida (GEORGE *et al.*, 2013). Segundo Sievert *et al.* (2009), tal necessidade torna o custo médio por paciente com câncer de bexiga urinária, do diagnóstico ao fim da vida, um dos maiores entre diversos tipos de câncer.

Um fator intrigante sobre o câncer de bexiga urinária é que os homens são de três a quatro vezes mais propensos a desenvolvê-lo do que as mulheres (SIEGEL *et al.*, 2013). No entanto, as chances de um homem vir a óbito em decorrência da doença são pouco maiores que duas vezes a encontrada em mulheres. Desta forma, mulheres diagnosticadas com câncer de bexiga urinária perdem mais anos de vida pós-diagnóstico (6,5 anos em mulheres *versus* 3,9 em homens) e maior parcela da expectativa de vida (47% em mulheres *versus* 33% em homens) (SCOSYREV *et al.*, 2012). Estudo recente da base de dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results Program*, mostrou que essa é uma das poucas malignidades em que as mulheres apresentam pior prognóstico do que os homens (NAJARI *et al.*, 2012).

Henning *et al.* (2013) observaram que não existem diferenças entre os gêneros ao que se refere aos sintomas clínicos ou apresentação (hematúria, irritação do trato urinário inferior) do câncer de bexiga urinária de pacientes recém-diagnosticados com a doença. No entanto, 78% dos homens, contra 55% das mulheres, visitaram um urologista após apresentarem esses sintomas. Além disso, apenas 19% dos homens contra 47% de mulheres receberam tratamento sintomático, sem análise profunda do motivo dos sintomas, um ano antes do diagnóstico do câncer de bexiga urinária. Tais dados sugerem que a diferença de abordagens utilizadas para homens e mulheres pode influenciar o momento do diagnóstico dessa doença, geralmente tardio nas mulheres, favorecendo a ocorrência de tumores mais agressivos e com pior prognóstico. Outra possível explicação para a diferença gênero-específica no câncer de bexiga urinária é a exposição excessiva a produtos químicos industriais, metais pesados, tinturas e, principalmente, ao cigarro. Porém, mesmo tendo esses fatores de risco sob controle, a diferença persiste (HARTGE *et al.*, 1990; FREEDMAN *et al.*, 2011). Consequentemente, a hipótese que tem sido mais discutida é a de que hormônios esteroides como andrógenos, estrógenos e glicocorticoides, e seus respectivos receptores, podem exercer um papel importante na promoção e progressão dos tumores de

bexiga urinária (MIYAMOTO *et al.*, 2012a; GAKIS & STENZL, 2013; DOBRUCH *et al.*, 2015).

Receptores de esteroides e câncer de bexiga urinária

Com a disparidade da incidência do câncer de bexiga urinária entre homens e mulheres, é natural que pesquisadores tenham começado a investigar o impacto de eixos hormonais como uma possível explicação biológica para o desenvolvimento da doença. A fim de avaliar a relevância desses eixos a níveis teciduais, muitos pesquisadores têm investigado a expressão de receptores de hormônios esteroides em amostras de bexiga urinária (MIYAMOTO *et al.*, 2012a). Muitos autores já relataram a presença de níveis significativos desses receptores, como os de estrógenos, andrógenos e glicocorticoides, em tumores de bexiga urinária (HSU *et al.*, 2013; HSU *et al.*, 2014; ISHIGURO *et al.*, 2014; LOMBARD & MUDRYJ, 2015).

O receptor de andrógenos (AR) é um conhecido fator de transcrição ligante-dependente, membro da superfamília de receptores nucleares, responsável pela regulação de determinados genes alvo. Este receptor atua em resposta à ligação específica de andrógenos, como a testosterona ou a 5 α -diidrotestosterona (DHT). A ligação andrógeno-AR induz uma mudança conformacional no receptor, resultando na translocação do complexo para o núcleo, aonde irá se ligar a elementos responsivos a andrógenos e, em conjunto com outros reguladores, controlar a transcrição de determinados genes (LI *et al.*, 2012; MUDRYJ & TEPPER, 2013). O AR está presente em diversos órgãos de camundongos, ratos, macacos e humanos. Na bexiga urinária saudável não há diferença na expressão entre homens e mulheres (TUYGUN *et al.* 2011, MASHHADI *et al.* 2014), bem como não há diferença significativa nos níveis desses receptores em tumores uroteliais masculinos e femininos (BOORJIAN *et al.*, 2004; TUYGUN *et al.*, 2011; KAUFFMAN *et al.*, 2011). A maioria dos estudos tem demonstrado a diminuição significativa da expressão do AR em tumores uroteliais de alto grau ou estágio (BOORJIAN *et al.*, 2004;

TUYGUN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; RAHMANI *et al.*, 2013), com a exceção de poucos trabalhos que não encontraram tal associação (WU *et al.*, 2010; MIYAMOTO *et al.*, 2012b).

Os estrógenos exercem suas funções fisiológicas e tecido-específicas através da ativação de seus receptores, que se ligam a essa classe de hormônios com alta afinidade e especificidade. Suas duas subunidades, ER α e ER β , também pertencem à superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição e regulam diversos aspectos da fisiologia normal de um organismo (GEORGE *et al.*, 2013). Em humanos e roedores, o ER β é a subunidade predominante na bexiga urinária saudável, uma vez que alguns estudos relatam expressão fraca da subunidade ER α ou até sua ausência (CROFT *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2006; BOLENZ *et al.*, 2009). Diversos estudos envolvendo o câncer de bexiga urinária e esses receptores têm trazido resultados inconsistentes sobre o quanto sua expressão está envolvida com os diferentes estádios e graus de tumores uroteliais. A pequena maioria dos estudos parece concordar que os níveis de ER β estão aumentados no câncer de bexiga urinária e sua expressão está relacionada a prognósticos ruins (KONTOS *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012; MIYAMOTO *et al.*, 2012b). Por sua vez, o papel do ER α permanece contraditório, pois parece estar diminuído na maioria dos tumores uroteliais estudados (CROFT *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2006; BOLENZ *et al.*, 2009). No entanto, George *et al.* (2013) relataram que camundongos induzidos com BBN (*N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine*) para o câncer de bexiga urinária passaram a expressar ER α , ausente no urotélio normal, e que esse fato pode ter favorecido a tumorigênese.

Os glicocorticoides exercem seu mecanismo de ação ligando-se a dois tipos de receptores intracelulares: o receptor de mineralocorticoides (MR) e o receptor de glicocorticoides (GR). Tem-se evidenciado que os MRs são responsáveis pela ligação aos glicocorticoides nas situações em que esses se apresentam a níveis basais, enquanto os GRs são ativados em situações de aumento dos níveis circulantes de glicocorticoides, como condições de estresse ou infecções (LIBERMAN *et al.*, 2007). O seu mecanismo de ação é semelhante ao de outros receptores

nucleares, atuando como fator de transcrição para genes relacionados à produção e à liberação de mediadores inflamatórios (CHROUSOS & KINO, 2005; McBETH *et al.*, 2015). O GR pode ser expresso na forma de duas subunidades, GR α e GR β . Os glicocorticoides circulantes controlam os processos celulares anti-inflamatórios via ligação e ativação da subunidade GR α . Desta forma, as propriedades antiproliferativas dos glicocorticoides ocorrem via ativação de GR α , que atua como fator de transcrição e aumenta a produção de proteínas indutoras da parada do ciclo celular (p27 e p21) (KUMAR *et al.*, 2004), bem como PTEN, envolvida em processos pró-apoptóticos (YEMELYANOV *et al.*, 2007). Em contraste ao GR α , a subunidade GR β não apresenta o domínio de ligação para os glicocorticoides, não podendo se ligar aos mesmos (HINDS JR. *et al.*, 2010). Desta forma, essa subunidade é induzida por outras vias inflamatórias, como as ativadas por TNF α e NF- κ B, sugerindo um papel importante no aumento da inflamação, que está diretamente relacionada com o câncer de bexiga urinária (TRIKHA *et al.*, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que o GR desempenha um papel importante nos tumores uroteliais, no entanto o mecanismo preciso permanece desconhecido. Os níveis de GR apresentam-se reduzidos em tumores, comparados ao urotélio normal, e em tumores com fenótipo invasivo, quando comparados a tumores de baixo grau (ISHIGURO *et al.*, 2014). Baixos níveis de GR parecem estar relacionados com um prognóstico pior do câncer de bexiga urinária e podem predizer altas chances de recorrência de tumores não músculo-invasivos (ZHENG *et al.*, 2012).

Comportamento materno

Eventos adversos no início da vida têm sido relacionados a alterações no desenvolvimento do cérebro e, na vida adulta, com mudanças nas respostas comportamentais e fisiológicas a situações de estresse, nas respostas imunes a patógenos e na susceptibilidade a doenças infecciosas e inflamatórias (McEWEN *et al.*, 2012; BREIVIK *et al.*, 2015). Experiências

nos primeiros dias de vida, em particular, podem alterar permanentemente a reatividade de circuitos controlados pelo cérebro, como o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) e hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (PRYCE *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2005; CHAMPAGNE, 2008; CHAMPAGNE & CURLEY, 2009; BREIVIK *et al.*, 2015). A desregulação imune e metabólica, causada pelas alterações do eixo HHA, é uma importante via de ligação entre os eventos no início da vida e a posterior susceptibilidade aumentada a uma série de doenças (THAKER *et al.*, 2006; THAKER *et al.*, 2007; McEWEN *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos revisados por Langley-Evans (2015) levaram à asserção de que fatores ligados ao comportamento materno, influenciando o crescimento e desenvolvimento de filhotes, podem também alterar a função tecidual, refletindo na fisiologia do organismo adulto. Evidências também sugerem que o baixo peso ao nascimento e início da vida pode modular a resposta do eixo HHA, aumentando a reatividade do indivíduo a situações de estresse na vida adulta (XIONG & ZHANG, 2010; KAJANTIE & RAIKKONEN, 2010; DUNKEL SCHETTER & TANNER, 2012).

A separação materna por períodos breves ou prolongados é um método experimental bem definido, que visa induzir comportamentos maternos distintos para observação dos seus efeitos sobre a prole na vida adulta (BOYD *et al.*, 2010; SCHULER & AUGER, 2010; NISHI *et al.*, 2013). A mudança das interações comuns entre mãe e filhote tem-se mostrado capaz de induzir alterações permanentes na neurobiologia, fisiologia e comportamento de animais na vida adulta, todas causadas pela programação da responsividade do eixo HHA ao estresse (LYONS *et al.*, 1998; PRYCE *et al.*, 2005; ENTHOVEN *et al.*, 2008). Períodos longos de separação materna (ex: 4 horas) durante o período pós-natal causam hiper-reatividade do eixo HHA na vida adulta. Por outro lado, períodos curtos de privação do contato materno (ex: 15 minutos) são considerados manipulações estimulantes, capazes de reduzir a ansiedade e a responsividade ao eixo HHA, gerando respostas mais brandas ao estresse (NISHI *et al.*, 2013).

Estudos utilizando a separação materna durante o período neonatal mostraram a relação entre a potencialização da resposta do eixo HHA ao estresse, causada pelas diferenças no comportamento materno, com o aumento e progressão de tumores e a incidência de carcinomas invasivos (BOYD *et al.*, 2010; SCHULER & AUGER, 2010). Boyd *et al.* (2010) observaram que a incidência de lesões neoplásicas induzidas na mama foi maior em fêmeas expostas a períodos longos de separação materna, concluindo que o estresse crônico da separação materna prolongada no início da vida aumenta o risco de desenvolvimento de tumores em camundongos.

Em nossos estudos prévios com ratas UChA e UChB, linhagens classicamente utilizadas para estudos sobre alcoolismo crônico (MARDONES & SEGOVIA-RIQUELME, 1983), provenientes do Chile (UCh - Universidade do Chile) e trazidas ao Instituto de Biociências em 1999, observamos que as linhagens possuem comportamento materno diferenciado: UChA - alto cuidado materno e UChB - baixo cuidado materno (MARTINS, 2007; AMORIM *et al.*, 2011; LUPI JÚNIOR (dados não publicados)). Em estudo subsequente, observamos que animais criados por fêmeas UChB desenvolveram lesões com estadiamento mais grave, quando comparados àqueles criados por mãe UChA. A adoção cruzada de filhotes de uma linhagem para outra influenciou no estágio das lesões, sugerindo a correlação entre o comportamento materno e o desenvolvimento de lesões uroteliais, à medida que animais UChB criados por mãe UChA apresentaram menor porcentagem de lesões graves, quando comparados aos filhotes UChB criados por mãe UChB. Apoiando esses resultados, Stöhr *et al.* (2000) observaram que a linhagem Fischer 344, modelo também utilizado para estudo do câncer vesical, possui hiperreatividade ao estresse comparado à linhagem Lewis, mais resistente ao desenvolvimento do câncer de bexiga urinária (REIS *et al.*, 2014).

Assim, formulamos a hipótese de que o comportamento materno e suas consequentes modulações fisiológicas influenciam o desenvolvimento de tumores vesicais induzidos. Procurando entender a etiologia e o desenvolvimento desses tumores e sua relação com o

comportamento materno, propusemos comparar comportamentos maternos extremos (intenso e negligente), para estudar a influência dos cuidados maternos recebidos pela prole e a consequente modulação de eixos hormonais (HHA e HHG), no desenvolvimento de lesões neoplásicas não músculo-invasivas da bexiga urinária.

Objetivos

O estresse crônico e o câncer são problemas de saúde pública mundial, tornando-se necessário o conhecimento mais aprofundado de suas formas de desenvolvimento. Além disso, os casos de abuso e abandono na infância, bem como sua influência na vida adulta, são cada vez mais frequentes e suas consequências orgânicas têm sido gradativamente estudadas.

Em ratos, sabe-se que as experiências no início da vida, representadas pelas interações entre mãe e filhote, modulam o desenvolvimento de importantes eixos hormonais. Tal modulação tem grande impacto na vida adulta e está relacionada a alterações metabólicas e desordens orgânicas, que favorecem o desenvolvimento de enfermidades graves como o câncer.

Com base em nossos estudos anteriores, ao encontrarmos que variações no comportamento materno influenciam a fisiopatologia do câncer de bexiga urinária, formulamos a hipótese que pode haver influência dos receptores de esteroides, relacionados aos eixos HHA e HHG, nesse processo. Para testar essa hipótese, utilizamos técnicas conhecidas de separação materna neonatal e estudamos o desenvolvimento experimental de tumores vesicais na vida adulta, bem como a expressão de receptores de esteroides na bexiga urinária normal e em tumores uroteliais.

Assim, tivemos por objetivos:

Objetivo geral:

- avaliar os efeitos do comportamento materno, durante o período pós-natal, e sua consequente modulação de eixos hormonais, no câncer de bexiga urinária induzido quimicamente com MNU na vida adulta.

Objetivos específicos:

- realizar a avaliação histopatológica do câncer de bexiga urinária, induzido quimicamente, em ratas que foram criadas por mães com comportamentos maternos extremos (intenso e negligente);

- avaliar a expressão dos receptores de esteroides ($ER\alpha$, $ER\beta$, AR e GR) no desenvolvimento de tumores vesicais;
- avaliar a expressão da proteína p53 no câncer de bexiga urinária nos diferentes tipos de tumores e nas situações experimentais utilizadas.

Materiais e métodos

Dezesseis casais das linhagens de ratos UChA e UChB (n=8 casais/linhagem) foram obtidos do Biotério de Matrizes do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu – IBB/UNESP para serem utilizados neste estudo. O experimento foi conduzido em biotério experimental, do mesmo departamento, sob condições controladas de temperatura e umidade e ciclo claro-escuro de 12/12h, alternando às 6 e 18 horas. Todos os protocolos experimentais seguiram os princípios éticos em pesquisa adotados pelo Colégio Brasileiro de Ética no Uso Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA (Protocolo 591 – CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu.

Os animais foram alocados em caixas individuais cobertas com grades de aço inox, forradas com maravalha estéril e seca e com ração e água *ad libitum*. Após uma semana de adaptação ao novo ambiente, os oito casais de cada linhagem foram formados, aleatoriamente, respeitando as linhagens (UChA ou UChB) de origem. Quando prenhas, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas em caixas individuais. A gestação foi acompanhada diariamente, duas vezes ao dia, sendo as caixas e o biotério limpos uma vez por semana.

O dia do nascimento de cada ninhada foi considerado dia pós-natal 0, servindo como referência para o seguimento dos protocolos experimentais. No dia 1 pós-natal foi realizada sexagem das ninhadas, seguida de padronização em oito filhotes por ninhada, preferencialmente quatro machos e quatro fêmeas. Dos dias 2 a 14 pós-natal, as ninhadas UChA, cujas mães apresentam cuidado materno ativo, foram submetidas à separação materna curta; enquanto as ninhadas UChB, cujas mães apresentam cuidado materno passivo, passaram por separação materna longa. Ambos os protocolos de separação materna foram realizados no período da manhã (9h) e foram descritos por Boyd *et al.* (2010), como a seguir:

Separação materna curta (SMC): cada ninhada foi retirada dos cuidados de sua mãe e colocada em uma caixa separada, limpa e forrada, pelo período de 15 minutos. Da mesma forma, a mãe foi removida de sua caixa de origem e alocada nas mesmas condições citadas anteriormente. Decorrido o tempo de separação, primeiro a mãe, seguida pela ninhada, foram devolvidas à sua caixa de origem. Esse procedimento visou intensificar os cuidados maternos, modulando uma resposta mais branda do eixo HHA na vida adulta;

Separação materna longa (SML): cada ninhada foi separada de sua mãe e colocada em uma caixa separada, limpa e forrada, pelo período de 4 horas. A fêmea também foi removida, pelo mesmo período. Após as 4 horas de separação, a mãe, seguida por sua ninhada, foram devolvidas à caixa de origem. Esse procedimento foi utilizado a fim de diminuir os cuidados maternos, modulando a hiper-responsividade do eixo HHA ao estresse na vida adulta.

Avaliação do comportamento materno

Foram realizadas observações do comportamento materno a fim de certificar se os protocolos de separação estavam resultando nos tipos de cuidados inicialmente propostos neste experimento. A análise do comportamento materno foi feita observando-se determinadas ações que as mães realizam, ou não, com a sua ninhada e que permitiram caracterizar seu comportamento como ativo ou passivo. Tais parâmetros já foram utilizados em diversos estudos para caracterização do comportamento materno (FRANCIS, 1999; LEVINE *et al.*, 2001). São eles: *carregar*, quando a fêmea morde gentilmente a região dorsal do filhote e o carrega para protegê-lo ou agrupá-lo com outros filhotes; *amamentar com o dorso arcado*, quando a fêmea assume posição arqueada, com os membros firmes e simétricos e a cabeça baixa, abrindo espaço e permitindo que os filhotes se alimentem; *amamentar passivamente*, quando a mãe realiza outras atividades como comer, se hidratar ou até dormir, enquanto os filhotes têm de se mover até a fêmea para conseguir se alimentar, ação que não é facilitada pela mãe; *lamber*, quando a

mãe lambe os filhotes nas regiões anogenital e dorso, mantendo-os limpos e fornecendo importantes estímulos para o desenvolvimento da ninhada; *contato*, observado quando a fêmea repousa com a ninhada, mantendo-os aquecidos, ou quando se aproxima dos filhotes para protegê-los de quaisquer ameaças; *ausência de contato*, quando a mãe mantém-se distante de sua ninhada.

As observações do comportamento materno foram realizadas nos dias 4 e 8 pós-natal, na fase clara (8h - 10h), sendo que cada análise durou 60 minutos, divididos em vinte observações a cada 3 minutos. Para análise dos dados foi utilizada a frequência, e não a duração, com que cada uma das ações foi observada.

Todos os filhotes foram pesados nos dias 14, último dia de realização dos protocolos de separação, e 21, quando foi realizado o desmame. Após desmame, as fêmeas foram separadas em grupos de dois ou três animais por caixa, entre irmãs, a fim de se evitar o impacto social do isolamento. Os filhotes machos passaram por eutanásia.

Formação dos grupos experimentais

Dois grupos experimentais foram formados de acordo com as linhagens e com os protocolos de separação materna ao qual foram submetidos: **SMC+MNU**, formado por fêmeas UChA, submetidas ao procedimento de separação materna curta e induzidas quimicamente para o câncer de bexiga urinária; e **SML+MNU**, formado por fêmeas UChB, submetidas à separação materna longa e induzidas quimicamente para o câncer de bexiga urinária.

Os animais controle não foram induzidos quimicamente para o câncer de bexiga urinária com N-metil-N-nitrosureia (MNU), porém foram submetidos ao protocolo de separação materna e simulação de indução com substância inócua (tampão citrato), formando os seguintes grupos experimentais: **SMC**, formado por fêmeas UChA, submetidas ao procedimento de separação materna curta, e utilizadas como controle simulado (*sham*) para a técnica de indução química do

câncer de bexiga urinária; **SML**, formado por fêmeas UChB, submetidas à separação materna longa e utilizadas como controle *sham* para indução do câncer de bexiga urinária.

Indução química do câncer de bexiga urinária

Aos 120 dias de idade, quando adultas, as fêmeas dos grupos SMC+MNU e SML+MNU iniciaram os protocolos de indução química do câncer de bexiga urinária com MNU. As ratas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de solução 1:1 (0,1ml/100g de peso corporal) de cloridrato de xilazina 2% (5mg/kg) e cloridrato de ketamina 10% (60mg/kg) e instiladas intravesicalmente via cateter flexível, com uma dose de 1,5 mg/Kg de MNU, dissolvida em tampão citrato de sódio (1M, pH 6,0), a cada 15 dias (semanas 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses do carcinógeno (FAVARO *et al.*, 2012). Os grupos SMC e SML foram instilados com o mesmo volume de veículo (tampão citrato), sem MNU. Os grupos SMC e SML destinaram-se a controlar os efeitos da introdução do cateter flexível pela uretra. Na semana 8, duas semanas após a última dose do carcinógeno ou veículo, os animais passaram por eutanásia, com dose letal (0,3ml/100g de peso corporal) da mesma solução de anestésicos, e tiveram seu sangue e bexiga urinária coletados para análises posteriores. As bexigas urinárias foram previamente analisadas em lente de aumento e posteriormente seccionadas em duas metades. Uma delas foi congelada e utilizada para análise dos níveis proteicos via *western blotting* e a outra foi fixada para análises histopatológica e imuno-histoquímica.

Análise histopatológica

Amostras da bexiga urinária dos quatro grupos experimentais foram coletadas e fixadas em solução de formaldeído 4% por 24 horas. Após período de fixação, os tecidos foram lavados em álcool 70%, seguindo para desidratação em série crescente de álcoois. Os fragmentos foram diafanizados em álcool butírico e, posteriormente, submetidos à inclusão em polímeros plásticos

(Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Após inclusão, o material foi seccionado em micrótomo, produzindo cortes com 5 µm de espessura, que foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e analisados em fotomicroscópio. Os diagnósticos foram realizados de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde:

Urotélio normal: consiste de epitélio estratificado de transição formado por, geralmente, menos de cinco camadas de células uroteliais cobertas por uma camada de células em guarda-chuva. O tamanho normal de uma célula urotelial é, aproximadamente, três vezes maior do que o de um linfócito, facilmente encontrado na lâmina própria;

Hiperplasia plana: caracteriza-se pelo epitélio evidentemente espesso, sem a presença de atipia celular. Não é necessária contagem do número de camadas celulares, sendo suficiente apenas o aumento evidente do número de camadas de células uroteliais;

Hiperplasia papilífera: apresenta aspecto elevado, ondulado, com espessuras variáveis em diferentes áreas do urotélio e ausência de atipia celular. A lesão, geralmente, apresenta alguns capilares dilatados em sua base, porém sem eixo fibrovascular definido;

Metaplasia escamosa: caracterizada pela substituição do urotélio por células características de tecido epidermoide. É frequente o acúmulo de placas de tecido queratinoso no polo superior do urotélio ou de pontos de cornificação no interior do tecido;

Neoplasia intraurotelial de baixo grau: trata-se de uma neoplasia de baixo potencial maligno, caracterizada pelo arranjo ordenado das células com mínimas atipia celular e nuclear, independente do número de camadas. O urotélio apresenta-se, geralmente, espessado e levemente hipercromático. As figuras mitóticas aparecem, mas estão confinadas à camada basal;

Neoplasia intraurotelial de alto grau - carcinoma *in situ* (pTis): lesão urotelial plana que tem sido sugerida, em alguns casos, como precursora de lesões uroteliais invasivas. É caracterizada pela presença de células com núcleos aumentados, irregulares e hipercromáticos, que podem

estar presentes em todo o urotélio ou confinados à apenas uma parte dele. As figuras mitóticas são mais frequentes, apresentando-se do meio até o polo superior do urotélio;

Carcinoma urotelial papilífero (pTa) de baixo grau: é caracterizado por uma aparência geral organizada, apesar do crescimento em forma de projeções papilíferas, mas apresenta alterações de elementos estruturais e celulares, como: variações na polaridade do epitélio, tamanho dos núcleos e forma e densidade da cromatina, características de atipia celular leve. As figuras mitóticas são raras, apresentando-se geralmente na metade inferior do urotélio;

Carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau: é caracterizado pelo arranjo desordenado do tecido, mesmo em pequenos aumentos. Tal desordem é resultante de importantes alterações estruturais e celulares: grupamentos irregulares de células, pleomorfismo moderado a severo, nucléolo muito evidente e, geralmente, em quantias anômalas, além de figuras mitóticas comuns, em todos os níveis celulares.

Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): caracterizado pela desorganização do urotélio e presença de grupos ou ninhos de células uroteliais atípicas no interior da lâmina própria. É comum observarem-se projeções das camadas uroteliais em direção à lâmina própria.

Imuno-histoquímica

Foi realizada a análise da reatividade imuno-histoquímica da bexiga urinária nos quatro grupos experimentais (n=5/grupos SMC e SML; n=7/grupos SMC+MNU e SML+MNU) para as proteínas: ER α , ER β , AR, GR e p53. As amostras foram provenientes dos mesmos tecidos usados para análise histopatológica e *western blotting*. As lâminas foram colocadas em estufa a 64°C por uma hora para início do processo de desparafinização, que foi finalizada em xilol. Posteriormente, passaram por hidratação em série decrescente de álcoois. A recuperação antigênica foi realizada através da incubação das lâminas em tampão Tris-EDTA por 40 minutos

em panela de pressão (100°C). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com solução de H₂O₂ diluída a 3% em metanol. Posteriormente, as lâminas foram incubadas por uma hora em leite desnatado 3% para bloqueio das ligações inespecíficas e, finalmente, incubadas com os anticorpos primários, diluídos em BSA 1%, *overnight*: ER α e ER β (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:100), AR (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:100), GR (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:100) e p53 (*EMD Millipore Corporation*, 1:50). Após série de lavagem dos cortes em tampão PBS, foi realizada incubação com anticorpo secundário (*anti-rabbit* ou *anti-mouse*) por uma hora (*Sigma-Aldrich Corporation*, 1:100). Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB), contracolorados com hematoxilina de Harris e analisados em fotomicroscópio. A imunorreatividade do tecido às proteínas-alvo foi analisada de acordo com a intensidade das marcações em: ausente (-), fraca(+), moderada(++) e intensa(+++).

Western blotting

Fragmentos da bexiga urinária de todos os animais foram coletados e rapidamente congelados para, posteriormente, seguirem para extração e quantificação de proteínas totais e análises de *western blotting*. Os tecidos foram homogeneizados com tampão de extração RIPA + coquetel inibidor de proteases e submetidos à centrifugação a 4°C pelo período de 20 minutos a 14.000 rpm, para eliminar restos de tecido conjuntivo e outras substâncias insolúveis. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de proteínas totais, pelo método colorimétrico de Bradford, sendo as leituras feitas por espectrofotometria.

As amostras quantificadas foram diluídas em tampão Laemmli 1,5x e o correspondente a 45 μ g de proteínas foi aplicada em gel de SDS-Poliacrilamida 10%. Após eletroforese (100 v, 120 minutos), o material foi transferido para membrana de nitrocelulose, pelo método de transferência úmida (120 v, 90 minutos). Para bloqueio das ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com leite desnatado 3% por uma hora. Posteriormente, as membranas foram

incubadas *overnight* com anticorpos primários, diluídos em leite desnatado 1%: anti-ER α e ER β (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:200), anti-AR (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:200), anti-GR (*Santa Cruz Biotechnology*, 1:200), anti-p53 (*EMD Millipore Corporation*, 1:500) e anti- α -tubulina (*EMD Millipore Corporation*, 1:5.000). Após incubação, as membranas foram submetidas a três séries de lavagem com TBS-T, de 10 minutos cada, para, finalmente, serem incubadas com anticorpo secundário *anti-mouse* ou *anti-rabbit* (*Sigma-Aldrich Corporation*, 1:20.000), diluídos em leite desnatado 1%, por 90 minutos. Após nova lavagem com TBS-T, as membranas foram reveladas com o *kit* de detecção ECL (*Thermo Fisher Scientific*, MO, EUA). O sinal quimioluminescente das bandas foi capturado e sua intensidade calculada de acordo com sua densitometria óptica por um programa de análise de imagens (*Image J*). Os níveis de α -tubulina de cada amostra foram calculados e utilizados como controle endógeno positivo.

Análise estatística

Os dados foram representados como média \pm desvio-padrão. As análises estatísticas para duas variáveis independentes (separação materna e câncer) foram realizadas pelo teste *Two-way ANOVA*, complementado pelo teste de Tukey. Para análise de dados não paramétricos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significativos os testes que apresentaram resultado de $p < 0,05$. Para análise estatística e gráfica foram utilizados os programas *Sigma Plot version 12.5* e *GraphPad Prism 5*, respectivamente.

Resultados

Comportamento materno

Os resultados obtidos pela observação do comportamento materno das fêmeas UChA e UChB após os procedimentos de Separação Materna Curta (SMC) e Separação Materna Longa (SML), respectivamente, estão resumidos nos gráficos da Figura 1. A análise do comportamento materno pós-protocolo de separação, revelou que as mães da linhagem UChA apresentaram com maior frequência o comportamento de amamentar com o dorso arcado (43% das observações), seguido pelas ações de lambar (20%) e carregar (14%) seus filhotes. Para as mães da linhagem UChB, o padrão de comportamento mais frequente após quatro horas de separação foi o de não estabelecer contato com a ninhada (74%). A segunda ação mais frequentemente encontrada nesse grupo foi a de amamentar passivamente (21%).

Aos 14 dias, após serem separados pela última vez de suas mães, os filhotes tiveram seus pesos corporais mensurados (Figura 2). Os filhotes de mães UChB apresentaram peso corporal significativamente menor, quando comparados àqueles das mães UChA. Resultado semelhante foi encontrado aos 21 dias de vida, quando todos os filhotes passaram pelo desmame e foram separados das mães. Em ambas as ocasiões, a proporção do peso corporal se manteve, sendo o peso dos filhotes submetidos à SML, nos dias 14 e 21 de vida, 28% e 29%, respectivamente, menor que o dos filhotes submetidos à SMC.

Análise histopatológica

As lesões encontradas na bexiga urinária de cada um dos grupos experimentais estão representadas na Tabela 1. Os grupos controle (SMC e SML) não apresentaram nenhuma lesão macro ou microscópica no tecido urotelial. Por outro lado, as lesões encontradas nos grupos sob indução química do câncer de bexiga urinária com MNU (SMC+MNU e SML+MNU) foram: hiperplasia plana, metaplasia escamosa, carcinoma urotelial papilífero (pTa) de baixo grau,

carcinoma *in situ* (pTis), carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau, associado ou não a metaplasia escamosa e carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), associado ou não a metaplasia escamosa. O grupo SMC+MNU apresentou maior heterogeneidade das lesões, sendo a mais frequente o pTis (26,75%). No entanto, nesse grupo também foram observadas lesões mais brandas como hiperplasia plana (6,65%) e metaplasia escamosa isolada (6,65%). No grupo SML+MNU, a lesão mais frequentemente encontrada foi o pT1 associado a metaplasia escamosa (55%). Nas Figuras 3 e 4 estão representados cada um dos tipos de alterações encontrados nas bexigas urinárias.

Análise da imunorreatividade aos receptores de esteroides e à proteína p53

A intensidade da imunorreatividade da bexiga urinária às proteínas-alvo está representada na Tabela 2 e Figura 5. A intensidade da imunomarcção para os receptores ER α e ER β foi moderada em todos os grupos experimentais. Foi observada fraca imunorreatividade para o AR no grupo SML+MNU, enquanto nos grupos SMC, SML e SMC+MNU a reatividade observada variou de fraca a moderada. Por outro lado, a imunomarcção para o GR mostrou-se intensa no grupo SMC+MNU, enquanto o grupo SML+MNU mostrou reatividade fraca para esse receptor. A análise da imunorreatividade da bexiga urinária à proteína p53 revelou marcação moderada à essa proteína para todos os grupos experimentais.

Análise dos níveis de receptores de esteroides e da proteína p53

Os gráficos da análise densitométrica das proteínas ER α , ER β , AR, GR e p53 e os perfis representativos da quantificação das mesmas estão representados na Figura 6. A análise da quantificação das proteínas ER α e ER β não apresentou diferença entre os grupos. Os níveis da proteína AR apresentaram-se significativamente diferentes nos quatro grupos experimentais, sendo os níveis dos grupos com câncer (SMC+MNU e SML+MNU) menores, quando

comparados a seus controles. Além disso, o grupo SML+MNU apresentou níveis significativamente diminuídos de AR quando comparado ao grupo SMC+MNU. Curiosamente, somente o grupo SML+MNU apresentou níveis proteicos de GR e p53 significativamente diminuído quando comparado aos demais grupos.

Dosagem sérica de testosterona e 17 β -estradiol

Os gráficos representativos da dosagem de hormônios esteroides estão representados na Figura 7. Não foi observada diferença significativa entre os níveis séricos de testosterona e 17 β -estradiol apresentados pelos grupos experimentais ($p > 0,05$).

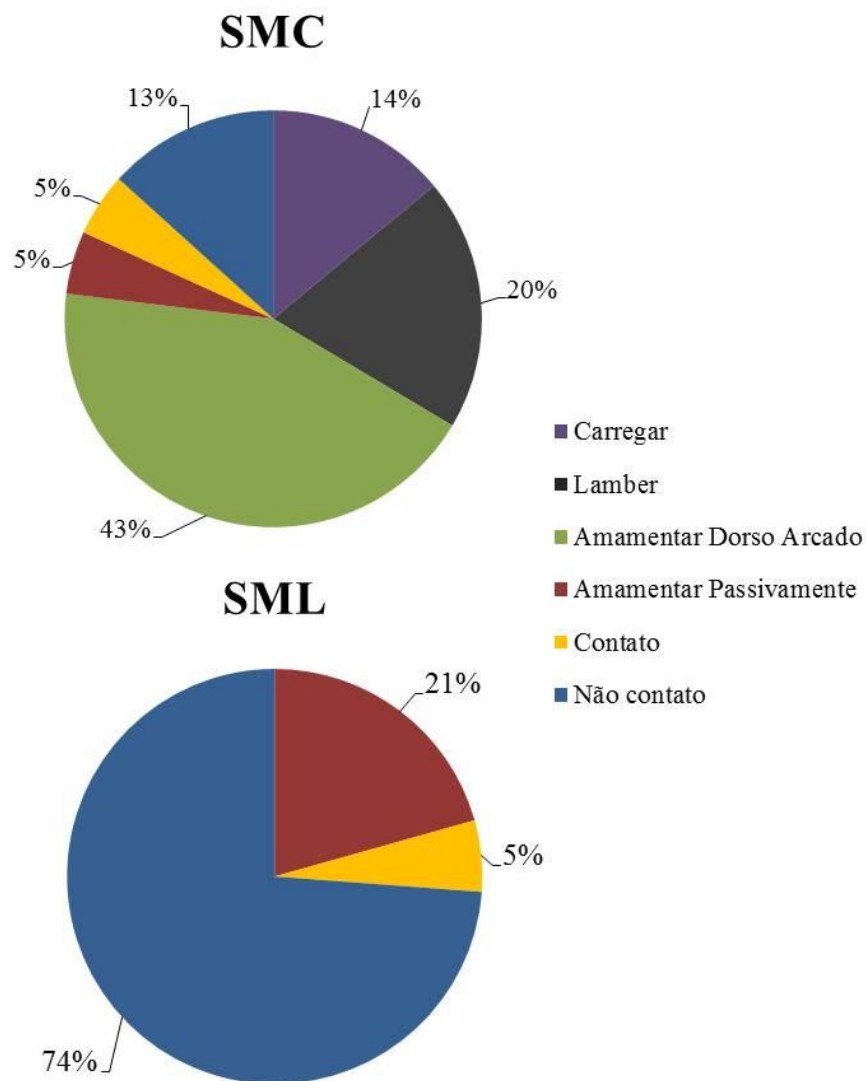


Figura 1. Distribuição da frequência dos parâmetros de comportamento materno observados nos diferentes protocolos de separação materna (n=8/grupo). SMC - Separação Materna Curta; SML - Separação Materna Longa.

Peso corporal das ninhadas nos dias 14 e 21 pós-natal

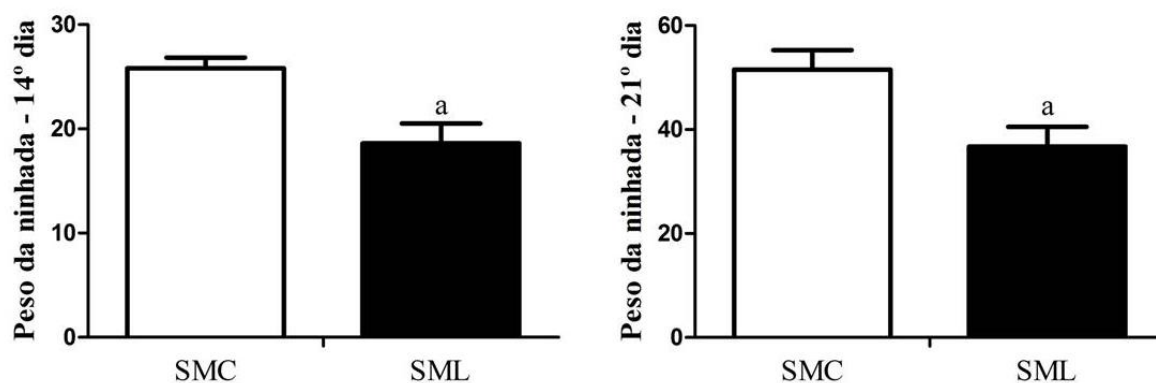


Figura 2. Peso corporal, em gramas, dos filhotes das linhagens UChA (SMC) e UChB (SML). Os dados estão representados pela média \pm desvio-padrão. Análise estatística: teste Mann-Whitney (dados não paramétricos); a: $p < 0,001$ vs SMC.

Tabela 1. Distribuição das alterações observadas na análise histopatológica da bexiga urinária por grupo experimental.

Histopatologia	Grupos experimentais			
	SMC (n=5)	SML (n=5)	SMC+MNU (n=15)	SML+MNU (n=20)
Urotélio normal	5 (100%)	5 (100%)	-	-
Hiperplasia plana	-	-	1 (6,65%)	-
Metaplasia escamosa	-	-	1 (6,65%)	-
Carcinoma urotelial papilífero (pTa) de baixo grau	-	-	2 (13,3%)	-
Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	-	4 (26,75%)	3 (15%)
Carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau	-	-	1 (6,65%)	2 (10%)
Carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau + metaplasia escamosa	-	-	3 (20%)	4 (20%)
Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1)	-	-	-	-
Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) + metaplasia escamosa	-	-	3 (20%)	11 (55%)

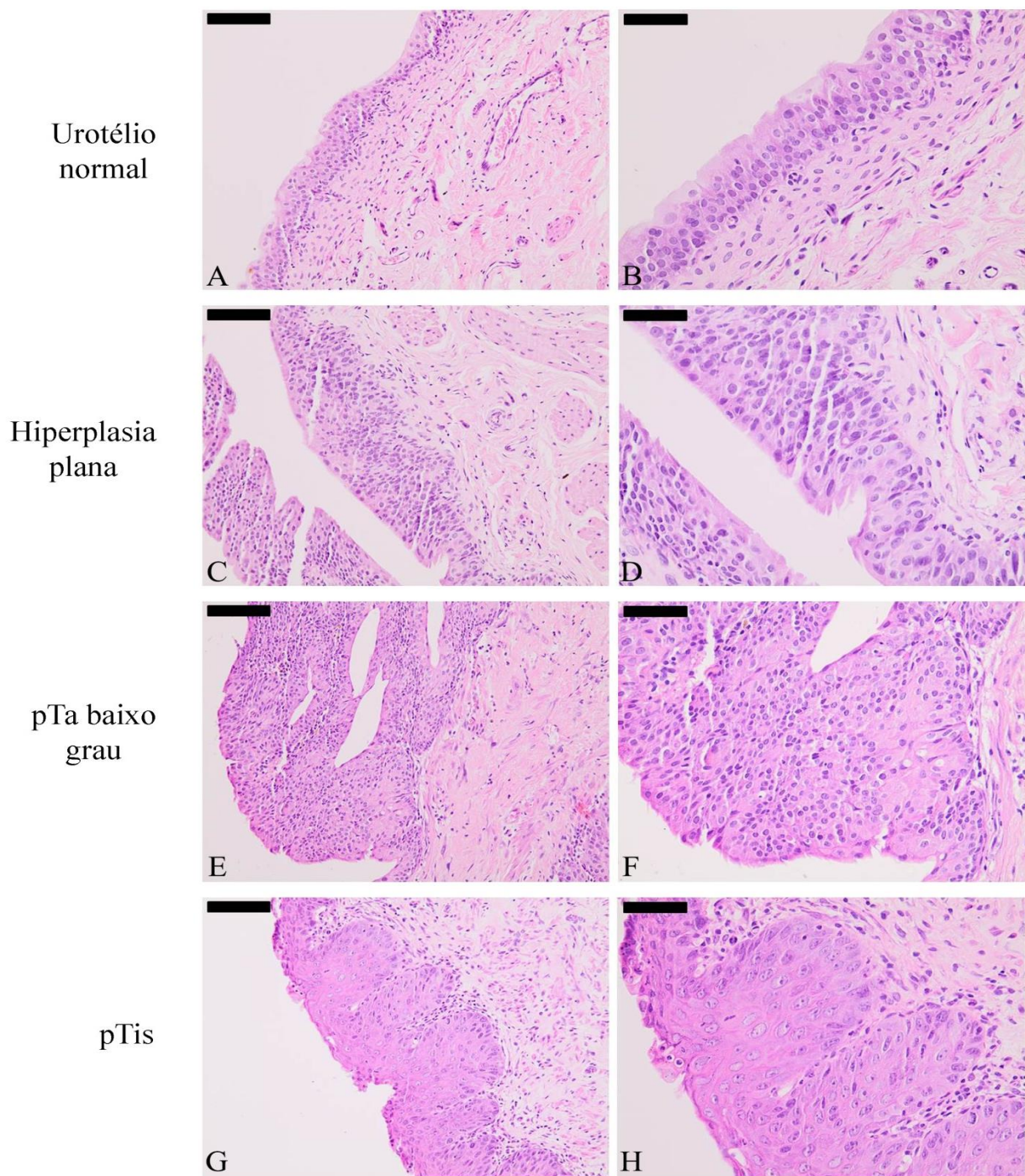


Figura 3. Fotomicrografias de alterações encontradas na análise histopatológica da bexiga urinária dos animais constituintes dos quatro grupos experimentais. A distribuição das lesões por grupo está representada na Tabela 1. Coloração H&E. A, C, E e G - barra = 100 μ m; B, D, F e H - barra = 50 μ m.

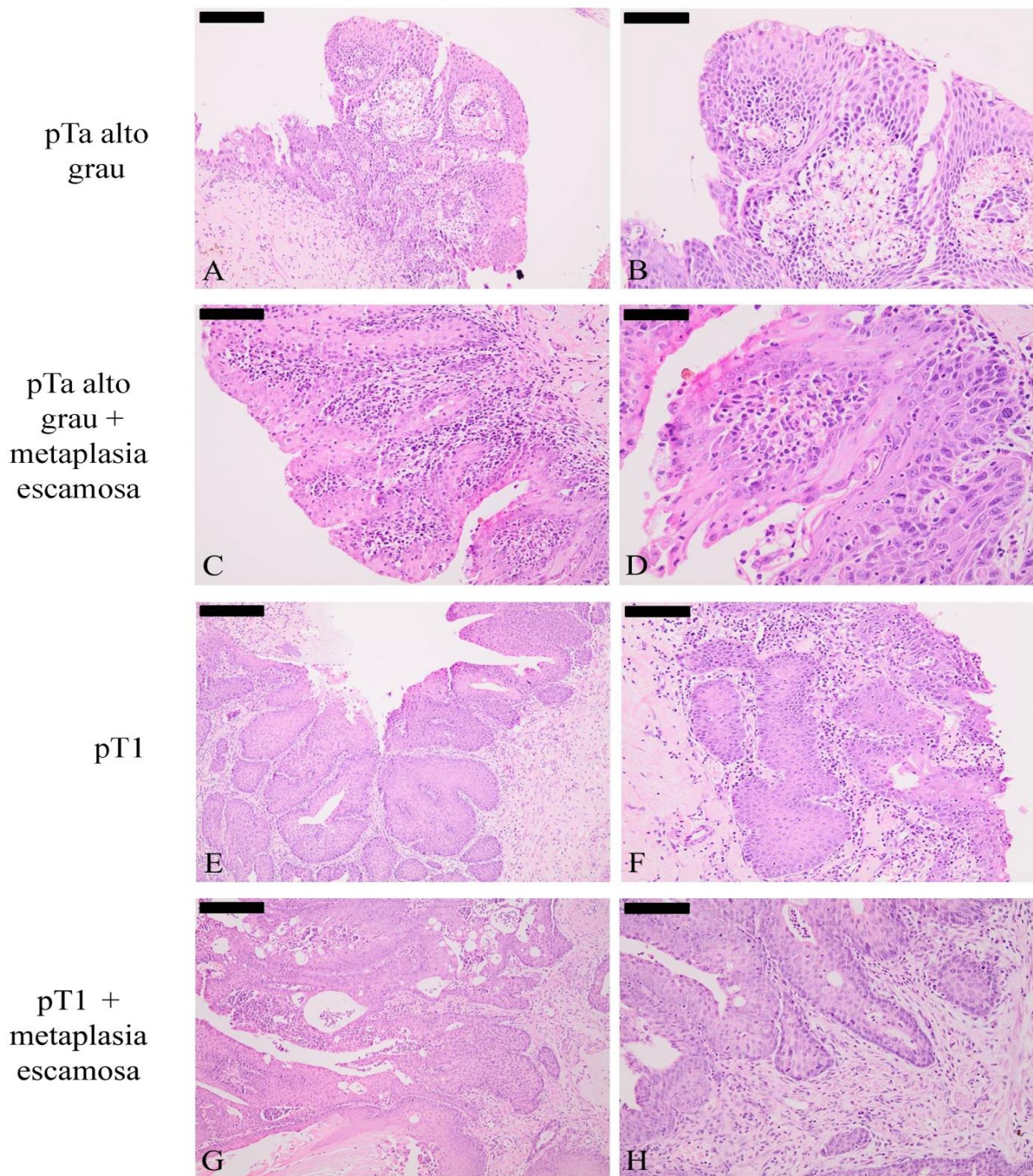


Figura 4. Fotomicrografias de alterações encontradas na análise histopatológica da bexiga urinária dos animais constituintes dos quatro grupos experimentais. A distribuição das lesões por grupo está representada na Tabela 1. Coloração H&E. A, C, E e G - barra = 100 μ m; B, D, F e H - barra = 50 μ m.

Tabela 2. Intensidade da imunoreatividade da bexiga urinária às proteínas-alvo

Proteínas	Grupos Experimentais			
	SMC	SMC+MNU	SML	SML+MNU
ER α	++	+/>++	++	++
ER β	+/>++	++	++	++
AR	+/>++	++	+/>++	+
GR	++	+++	++	+/>++
p53	++	++	+/>++	+/>++

Intensidade da imunomarcção na bexiga urinária. A intensidade da marcação foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) e/ou intensa (+++). n=5/grupos SMC e SML, n=7/grupos SMC+MNU e SML+MNU.

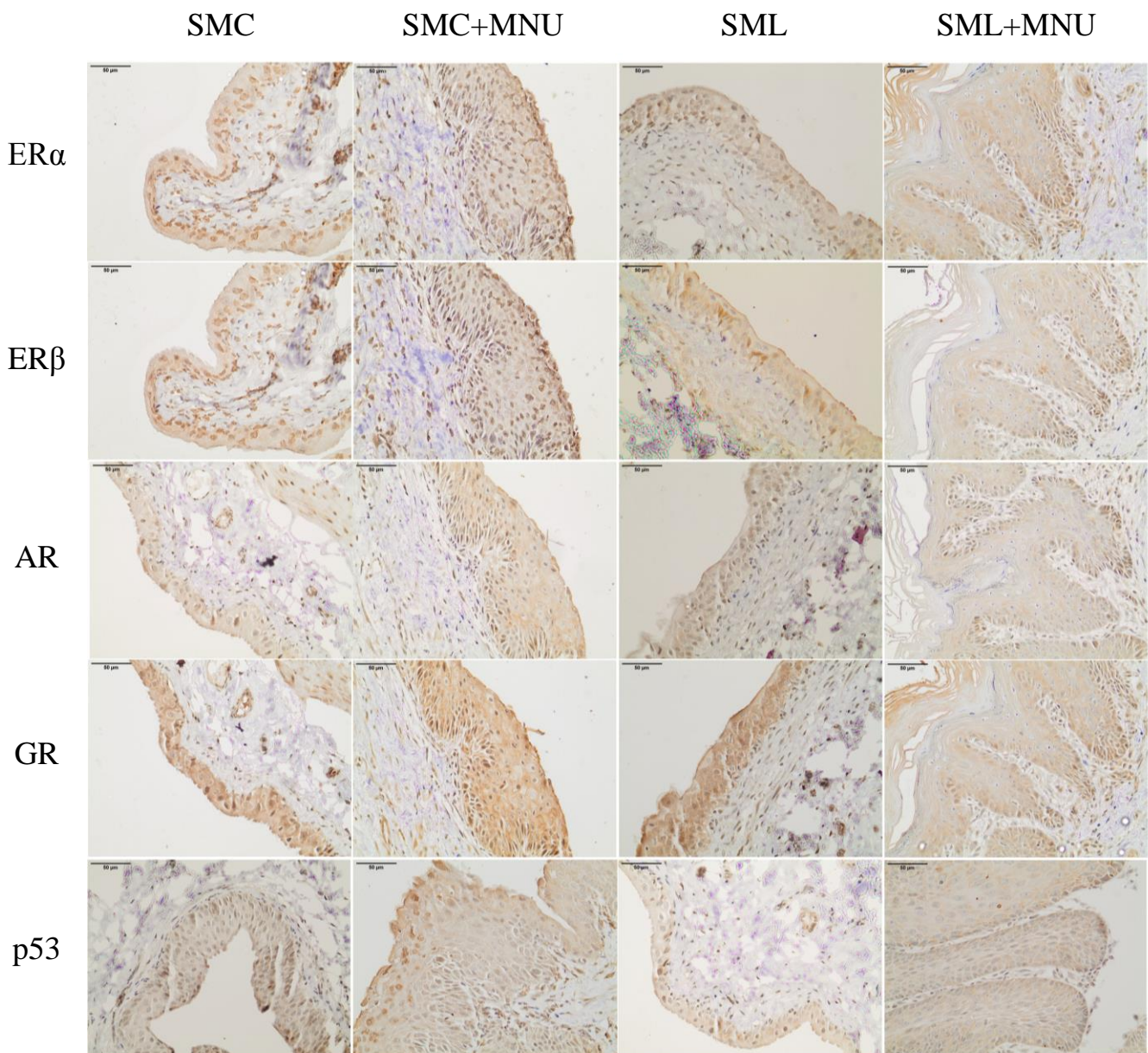


Figura 5. Fotomicrografias representando a imunorreatividade encontrada para cada proteína nos quatro grupos experimentais. A intensidade da marcação foi classificada como ausente (-), fraca (+), moderada (++) e/ou intensa (+++). n=5/grupos SMC e SML, n=7/grupos SMC+MNU e SML+MNU. Barra = 50 μ m.

Análise densitométrica dos níveis de ER α , ER β , AR, GR e p53 na bexiga urinária

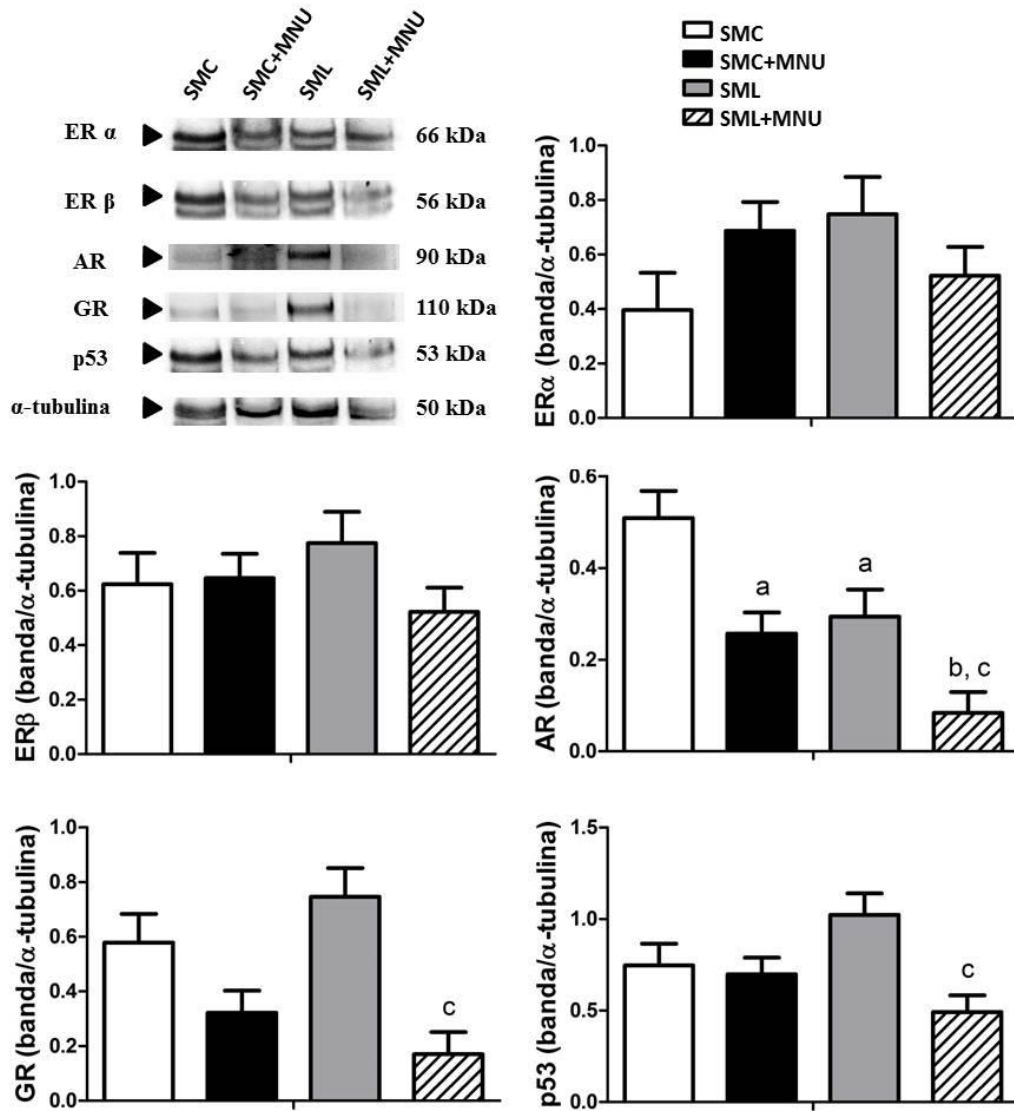


Figura 6. Perfil representativo e análise densitométrica das proteínas ER α , ER β , AR, GR e p53 nas amostras de bexiga urinária (n=5/grupo; 45 μ g de proteína). Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão. Análise estatística: teste *Two-way* ANOVA, complementado com teste de Tukey; a: p<0,05 vs SMC, b: p<0,05 vs SMC+MNU, c: p<0,05 vs SML.

Análise dos níveis séricos dos hormônios esteroides sexuais

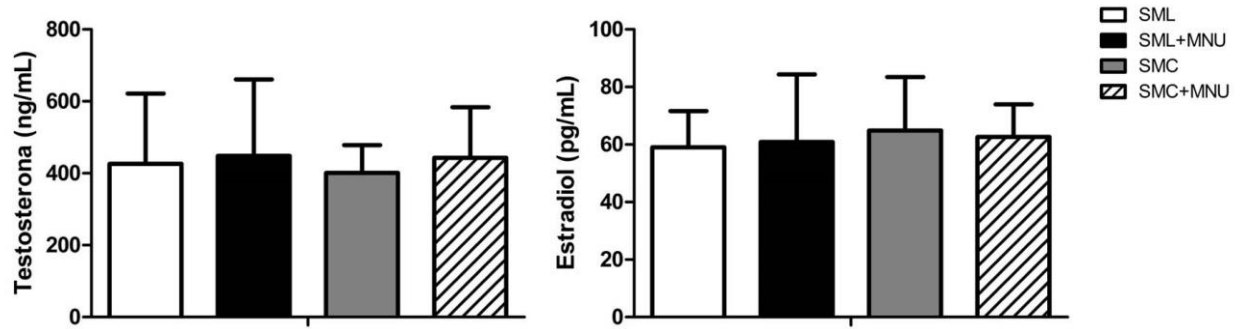


Figura 7. Níveis séricos de testosterona e 17β -estradiol ($n=5$ /grupos SML e SMC; $n=15$ /grupo SMC+MNU; $n=20$ /grupo SML+MNU). Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão. Análise estatística: teste *Two-way ANOVA*.

Discussão

A avaliação do comportamento materno realizada demonstrou o sucesso do modelo experimental proposto, pois ratas UChA apresentaram cuidado materno ativo e intenso após separação materna curta (SMC), enquanto mães UChB apresentaram-se passivas e negligentes após separação materna longa (SML). Em roedores, as experiências no início da vida estão diretamente relacionadas à interação mãe-filhote, uma vez que os cuidados maternos recebidos pelo neonato representam seu primeiro contato com o meio ambiente (LANGLEY-EVANS, 2015). O comportamento materno passivo ou a ruptura da interação mãe-filhote expõe o neonato a situações de estresse no início da vida, gerando um adulto com hiper-responsividade do eixo HHA a situações de estresse, através da modulação epigenética dos eixos hormonais (WALKER *et al.*, 2004; CHAMPAGNE, 2008; CHAMPAGNE & CURLEY, 2009; BURDGE & LILLYCROP, 2010; SU *et al.*, 2011). A ativação prolongada desse eixo leva a uma série de desordens orgânicas, como prejuízo da resposta imune e aumento da angiogênese e proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento de uma série de doenças, incluindo o câncer (THAKER *et al.*, 2006; THAKER *et al.*, 2007; McEWEN *et al.*, 2012).

Fêmeas que receberam cuidado materno negligente apresentaram menor peso corporal nos dias 14 e 21 pós-natal. O baixo peso corporal dos filhotes criados por mães negligentes, comparado àqueles que receberam cuidado materno intenso, concorda com o padrão de comportamento materno exibido pelas mães. Curiosamente, indivíduos nascidos abaixo do peso apresentam maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como doenças coronárias, diabetes tipo 2, declínio cognitivo e depressão (XIONG & ZANG, 2010; DUNKEL SCHETTER & TANNER, 2012). Evidências sugerem que o baixo peso ao nascimento e no início da vida contribui para modular a resposta do eixo HHA, aumentando sua reatividade a situações de estresse na vida adulta. O baixo peso corporal nas primeiras fases da vida foi relacionado à

propensão em desenvolver uma série de doenças na vida adulta (KAJANTIE & RAIKKONEN, 2010).

Após indução química do câncer de bexiga urinária, animais criados por mãe negligente (SML+MNU) apresentaram lesões de maior grau e estadiamento na bexiga urinária, como carcinoma urotelial papilífero (pTa) de alto grau e carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), em comparação com animais que receberam cuidado materno intenso (SMC+MNU). Esses achados mostram que o comportamento materno influenciou no desenvolvimento de tumores uroteliais. Em estudo dirigido por Boyd *et al.* (2010), fêmeas expostas ao estresse pós-natal da separação materna por longos períodos, desenvolveram alterações morfológicas e moleculares que resultaram na maior incidência de tumores de mama, semelhante ao que observamos na bexiga urinária neste estudo.

Frente à diferença na incidência do câncer de bexiga urinária entre homens e mulheres, que persiste mesmo após o controle de fatores de risco ocupacionais e relacionados a hábitos de vida (HARTGE *et al.*, 1990; FREEDMAN *et al.*, 2011), uma série de pesquisadores passaram a sugerir o envolvimento dos hormônios esteroides, presentes em níveis diferentes no sexo masculino e feminino, e seus receptores na etiologia desse tipo de câncer (MIYAMOTO *et al.*, 2012; GAKIS & STENZL, 2013; DOBRUCH *et al.*, 2015). Diversos estudos encontraram níveis significativos de AR, GR, ER α e ER β em tumores de bexiga urinária (HSU *et al.*, 2013; HSU *et al.*, 2014; ISHIGURO *et al.*, 2014; LOMBARD & MUDRYJ, 2015). Nossa análise dos níveis dos receptores esteroides revelou níveis diminuídos de GR e AR em tumores uroteliais. Não observamos diferença nos níveis de expressão de ERs em tumores da bexiga urinária.

Estudos moleculares têm demonstrado que a ativação de AR desempenha um papel importante na iniciação e progressão do câncer de bexiga urinária (LI *et al.*, 2012; RAHMANI *et al.*, 2013). Boorjian *et al.* (2004) encontraram expressão de AR em 26 de 49 tumores de bexiga urinária. Adicionalmente, a porcentagem de tumores com expressão de AR diminuiu conforme o

aumento da gravidade das lesões uroteliais, de 88,9% em tumores uroteliais papilífero de baixo grau para 0% em tumores músculo-invasivos. A perda na quantidade de AR foi reforçada em dois estudos subsequentes envolvendo 139 e 188 casos, respectivamente (TUYGUN *et al.*, 2011; MIYAMOTO *et al.*, 2012b). Por outro lado, análises de tumores superficiais da bexiga urinária utilizando *qRT-PCR* demonstraram que muitas células uroteliais neoplásicas eram AR-positivas e que o aumento da expressão desses receptores levou ao maior risco de recorrência dos tumores (WU *et al.*, 2010; MIYAMOTO *et al.*, 2012b). Estudos com terapias de privação de andrógenos ou animais *knockout* para AR evidenciaram que a ausência desse receptor leva à supressão da proliferação celular e ao aumento dos índices de apoptose *in vitro*, além da inibição do desenvolvimento de tumores transplantados *in vivo* (MIYAMOTO *et al.*, 2007). Estudos com modelos de animais induzidos com BBN também mostraram que camundongos machos castrados apresentaram baixo risco de desenvolvimento do câncer de bexiga urinária (HSU *et al.*, 2013), sugerindo um possível papel dos andrógenos no surgimento dessas lesões. De fato, Myiamoto *et al.* (2007) demonstraram que o câncer de bexiga urinária pode ser influenciado não apenas pela ligação dos andrógenos ao AR, como também pela ativação de outras vias por partes desses hormônios, como a da proteína CD24 (OVERDEVEST *et al.*, 2012). Em nosso experimento, os níveis séricos de testosterona não variaram entre os grupos experimentais. No entanto, quando comparados os níveis de AR no urotélio normal e em tumores uroteliais, observamos que há diminuição significativa da quantidade desse receptor no câncer de bexiga urinária. Comparando-se o padrão de tumores mais agressivos encontrados no grupo SML+MNU, observamos que os níveis proteicos, bem como a imunorreatividade ao AR apresentam-se diminuídos, quando comparados às lesões mais brandas encontradas no grupo SMC+MNU. Esses achados são consistentes com a maioria dos estudos envolvendo esse receptor. Recentemente, Li *et al.* (2012), em estudo de revisão, encontraram que os níveis de AR

estão predominantemente diminuídos em tumores uroteliais, em comparação ao urotélio normal, e também em tumores de alto grau, quando comparados aos de baixo grau.

Hsu *et al.* (2013) sugeriram o envolvimento de várias moléculas que são capazes de modular a atividade do AR, ou que são reguladas por sinais do mesmo receptor no desenvolvimento do câncer de bexiga urinária, entre elas a proteína p53. Alterações no gene dessa proteína, que atua na supressão de tumores, desenvolvem um papel importante na carcinogênese, estando diretamente associada à diminuição na sobrevivência de pacientes com tumores uroteliais (AHRENDT *et al.*, 2003). Diversos estudos indicam que a diminuição dos níveis da proteína p53 está diretamente associada a tumores uroteliais de alto grau, de comportamento invasivo, com alto risco de recorrência e quadros clínicos graves (AL HUSSAIN & AKHTAR, 2013). Em nosso estudo, os níveis da proteína p53 apresentaram-se significativamente diminuídos no grupo SML+MNU quando comparados ao urotélio normal e ao grupo SMC+MNU, concordando com os dados encontrados na literatura e reforçando a hipótese de interação entre a ação do AR e a proteína p53, uma vez que ambos se comportaram de forma semelhante no câncer de bexiga urinária.

O efeito de diferentes níveis circulantes de estrógeno na expressão de seus receptores e na progressão do câncer de bexiga urinária é pouco conhecido. Dados clínicos sugerem que mulheres no período de pós-menopausa apresentam maior risco de desenvolver o câncer de bexiga urinária, quando comparadas a mulheres na pré-menopausa, o que poderia dar suporte a um possível envolvimento dos níveis de estrógenos no desenvolvimento do câncer de bexiga urinária (MCGRATH *et al.*, 2006). Daugherty *et al.* (2013) mostraram que mulheres que passaram por terapia de reposição hormonal por 10 anos ou menos apresentaram 60% menos chances de desenvolver o câncer de bexiga urinária, quando comparadas a mulheres que nunca receberam tal reposição. Por outro lado, um estudo anterior não encontrou qualquer relação entre o uso de terapias de reposição hormonal e a incidência do câncer de bexiga urinária

(CANTWELL *et al.*, 2006). Em nossas análises, não observamos variação dos níveis de estrógenos de acordo com o comportamento materno recebido, não havendo diferença significativa na quantidade desse hormônio entre os grupos experimentais.

Diversos estudos envolvendo o câncer de bexiga urinária e receptores de estrógeno têm trazido resultados inconsistentes sobre o quanto a expressão do ER α e ER β está envolvida com os diferentes estádios e graus de tumores uroteliais. A maioria dos estudos tem indicado baixa porcentagem de tumores positivos para ER α (BASAKCI *et al.*, 2002; CROFT *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2006; BOLENZ *et al.*, 2009), com alguns estudos contrariando a detecção dessa proteína (BODKER *et al.*, 1995; WEI *et al.*, 2009). Um estudo relatou a expressão fraca do ER α em 27% das amostras de bexiga urinária, sem correlação de sua expressão com a recorrência de tumores, progressão ou índices de sobrevivência (MIYAMOTO *et al.*, 2012b). George *et al.* (2013) observaram expressão de ER α em tumores de bexiga urinária de camundongos induzidos, enquanto nenhuma expressão do receptor foi encontrada na bexiga urinária saudável, sugerindo a possibilidade de que a indução da expressão de ER α , após exposição a carcinógenos, pode contribuir para a tumorigênese. Miyamoto *et al.* (2012b) também observaram baixa expressão de ER α em tumores de alto grau (23%) e tumores invasivos da lâmina própria (19%), quando comparados a tumores de baixo grau (51%). Em oposição, os mesmos pesquisadores relataram maiores níveis de ER β em tumores de alto grau (58%) e invasivos da lâmina própria (67%), do que em tumores de baixo grau (29%). Além disso, os altos níveis de ER β parecem estar associados ao prognóstico pior, maior risco de mortalidade em decorrência do câncer de bexiga urinária, progressão de tumores de baixo grau e recorrência de tumores músculo-invasivos (MIYAMOTO *et al.*, 2012a). Uma série de outros estudos também tem apontado a existência de forte expressão de ER β no câncer de bexiga urinária, com mais de 81% dos tumores expressando essa isoforma (KONTOS *et al.*, 2010; KONTOS *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012). Da mesma forma, Shen *et al.* (2006) observaram o ER β como subtipo predominante em tumores uroteliais,

sendo detectado em 63% das tumores, além de ter seus níveis aumentados conforme o estágio de gravidade do tumor aumenta. Por outro lado, estudo recente em tumores com células altamente indiferenciadas e carcinomas uroteliais músculo-invasivos relatou a diminuição significativa dos níveis de ER β (KONTOS *et al.*, 2010). Da mesma forma, Kauffman *et al.* (2013) não encontraram associação entre os níveis de expressão de ER β e o estágio de tumores uroteliais, apesar de concordarem que existem maiores níveis desses receptores em tumores do que no urotélio normal. A quantificação dos receptores ER α e ER β em nosso estudo não apresentou associação entre a gravidade dos tumores uroteliais e os níveis desses receptores. Da mesma forma, não houve diferença entre os níveis de ER α e ER β encontrados no urotélio normal e nos tumores induzidos, bem como a imunorreatividade a esses mesmos receptores foi homogênea entre os quatro grupos experimentais. Possivelmente, para este modelo experimental que utiliza padrões de comportamento materno distintos, o desenvolvimento dos diferentes tipos de tumores uroteliais parece não estar sob influência do 17 β -estradiol e sua interação com os receptores ER α e ER β .

Ao contrário do que ocorre para o AR e ERs, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação e influência do GR no carcinoma de bexiga urinária, apesar de seu papel bem estabelecido envolvendo reações inflamatórias. O uso sistêmico de glicocorticoides foi relacionado com o aumento do risco em desenvolver câncer de bexiga urinária, mas presume-se que esse quadro seja resultado de imunossupressão (DIETRICH *et al.*, 2009). Em nosso estudo anterior, observamos que os níveis circulantes de glicocorticoides de animais criados por mães com baixos níveis de cuidados maternos estavam aumentados ($815,09 \pm 46,54$ ng/mL), comparados aos de animais que receberam altos níveis de cuidados maternos ($282,25 \pm 28,09$ ng/mL) e que apresentaram tumores uroteliais mais graves (dados não publicados¹). Em estudo recente, Ishiguro *et al.* (2014) encontraram níveis diminuídos de GR no núcleo de células de tumores

¹ Processo IC FAPESP 2011/09035-6 (Renovação). Título: Efeitos do comportamento materno na progressão do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo: avaliação histopatológica.

uroteliais, quando comparadas ao urotélio normal, relação que persistiu quando comparados tumores músculo-invasivos e tumores não-músculo invasivos de baixo grau. Também demonstraram que os baixos níveis de GR estão correlacionados com prognósticos piores do câncer de bexiga urinária, sugerindo que níveis maiores de GR podem estar relacionados à prevenção da recorrência e invasão de tumores uroteliais. Em estudos pré-clínicos com células de tumores uroteliais, a ativação específica do GR suprimiu a invasão e metástase dessas células (ZHENG *et al.*, 2012). A análise dos níveis de GR nos tumores de bexiga urinária neste estudo mostrou que os tumores mais graves, presentes no grupo SML+MNU apresentam níveis diminuídos desse receptor e fraca imunorreatividade do tecido ao GR. Como a principal subunidade marcada pelo anticorpo utilizado é a GR α , os resultados corroboram com o que tem sido observado na literatura, que os níveis de GR α diminuem em tumores de alto estágio, como os invasivos, sugerindo um possível papel protetor dessa subunidade, uma vez que sua perda esteve relacionada a tumores com fenótipo invasivo (pT1).

Concluimos que o comportamento materno influencia o desenvolvimento induzido do câncer de bexiga urinária, à medida que fêmeas que receberam cuidados maternos negligentes tiveram tumores mais graves, comparadas àquelas que receberam cuidado materno intenso. Essa influência está relacionada aos níveis de receptores de hormônios esteroides encontrados na bexiga urinária, especificamente AR e GR. No entanto, são necessários novos estudos envolvendo as vias de ação desses receptores, bem como dos produtos de sua ativação, a fim de melhor elucidar seus papéis na carcinogênese da bexiga urinária.

Referências bibliográficas

AHRENDT *et al.* p53 Mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute*, v.95, p.961-970, 2003.

AL HUSSAIN, T. & AKHTAR, M. Molecular basis of urinary bladder cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, v.20, p.53-60, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Learn about cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/>. Acesso em: 09 de outubro de 2015.

AMORIM, J.P.A. *et al.* Variations in maternal care alter corticosterone and 17beta-estradiol levels, estrous cycle and folliculogenesis and stimulate the expression of estrogen receptors alpha and beta in the ovaries of UCh rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, p.160-172, 2011.

BASAKCI, A. *et al.* Prognostic significance of estrogen receptor expression in superficial transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *European Urology*, v.41, p.342-345, 2002.

BØDKER, A. *et al.* Estrogen receptors in the human male bladder, prostatic urethra, and prostate. An immunohistochemical and biochemical study. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, v.29, p.161-165, 1995.

BOLENZ, C. *et al.* Estrogen and progesterone hormonal receptor expression in urothelial carcinoma of the bladder. *European Urology*, v.56, p.1093-1095, 2009.

BOORJIAN, S. *et al.* Androgen receptor expression is inversely correlated with pathologic tumor stage in bladder cancer. *Urology*, v.64, p.383-388, 2004.

BOYD, A.L. *et al.* Neonatal experiences differentially influence mammary gland morphology, estrogen receptor a protein levels, and carcinogenesis in BALB/c mice. *Cancer Prevention Research*, v.11, p.1397-1408, 2010.

BREIVIK, T. *et al.* Maternal deprivation of lewis rat pups increases the severity of experimental periodontitis in adulthood. *The Open Dentistry Journal*, v.9, p.65-78, 2015.

BURDGE, G.C. & LILLYCROP, K.A. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annual Review of Nutrition*, v.30, p.315-39, 2010.

CANCER RESEARCH UK. Cancer incidence and mortality in the UK. Disponível em: cruk.org/cancerstats. Acesso em: 09 de outubro de 2015.

CANTWELL, M.M. *et al.* Reproductive factors, exogenous hormone use and bladder cancer risk in a prospective study. *International Journal of Cancer*, v.119, p.2398-2401, 2006. CHAMPAGNE, F.A. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.29, p. 386-397, 2008.

CHAMPAGNE, F.A. & CURLEY, J.P. Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.33, p. 593-600, 2009.

CHROUSOS, G. P. & KINO, T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*, v.2005, p.48, 2005.

CROFT, P.R. *et al.* Estrogen receptor expression in papillary urothelial carcinoma of the bladder and ovarian transitional cell carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v.129, p.194-199, 2005.

DAUGHERTY, S.E. *et al.* Reproductive factors and menopausal hormone therapy and bladder cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *International Journal of Cancer*, v.133, p.462-472, 2013.

DIETRICH, K. *et al.* Glucocorticoid therapy and risk of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, v.101, p.1316-1320, 2009.

DOBRUCH, J. *et al.* Gender and bladder cancer: a collaborative review of etiology, biology, and outcomes. *European Association of Urology*, 2015, In Press: [dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.037](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.037)

DRAKE, R.L. *et al.* Gray's Anatomia Básica. São Paulo: Elsevier, 2013.

DUNKEL SCHETTER, C. & TANNER, L. Anxiety, depression and stress in pregnancy: implications for mothers, children, research, and practice. *Current Opinion in Psychiatry*, v.25, p.141-148, 2012.

ENTHOVEN, L. *et al.* Hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. *Endocrinology*, v.149, p.6366-6377, 2008.

FÁVARO, W.J. *et al.* Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infectious Agents and Cancer*, v.7, p.14, 2012.

FREEDMAN, N.D. *et al.* Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *The Journal of the American Medical Association*, v.306, p.737-745, 2011.

GAKIS, G. & STENZL, A. Gender-specific differences in muscle-invasive bladder cancer: the concept of sex steroid sensitivity. *World Journal of Urology*, v.31, p.1059-1064, 2013.

GEORGE, S.K. *et al.* Chemoprevention of BBN-induced bladder carcinogenesis by the selective estrogen receptor modulator tamoxifen. *Translational Oncology*, v.6, p.244-255, 2013.

GOMES, C.M. *et al.* Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology*, v.184, p.435-445, 2005.

HAN, B. *et al.* Estrogen receptor β (ER β) is a novel prognostic marker of recurrence survival in non-muscle-invasive bladder cancer potentially by inhibiting cadherin switch. *World Journal of Urology*, v.30, p.861–867, 2012.

HARTGE, P. *et al.* Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *Journal of the National Cancer Institute*, v.82, p.1636-1640, 1990.

HENNING, A *et al.* Do differences in clinical symptoms and referral patterns contribute to the gender gap in bladder cancer? *British Journal of Urology International*, v.112, p.68-73, 2013.

HINDS JR, T.D. *et al.* Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Molecular Endocrinology*, v.24, p.1715-1727, 2010.

HSU, J.W. *et al.* Decreased tumorigenesis and mortality from bladder cancer in mice lacking urothelial androgen receptor. *American Journal of Pathology*, v.182, p.1811–1820, 2013.

HSU, I. *et al.* Suppression of ER β signaling via ER β knockout or antagonist protects against bladder cancer development. *Carcinogenesis*, v.35, p.651–661, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Registros de Câncer de Base Populacional. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/regpop/2013>. Acesso em: 09 de outubro de 2015.

ISHIGURO, H. *et al.* Reduced glucocorticoid receptor expression predicts bladder tumor recurrence and progression. *American Journal of Clinical Pathology*, v.142, p.157-164, 2014.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica - Texto e Atlas*. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

KAJANTIE, E. & RÄIKKÖNEN, K. Early life predictors of the physiological stress response later in life. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.35, p.23-32, 2010.

KAUFFMAN, E.C. *et al.* Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer. *Molecular Carcinogenesis*, v.50, p.931–944, 2011.

KAUFFMAN, E.C. *et al.* Estrogen receptor- β expression and pharmacological targeting in bladder cancer. *Oncology reports*, v.30, p.131-138, 2013.

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

KONTOS, S. *et al.* Inverse expression of estrogen receptor- β and nuclear factor- κ B in urinary bladder carcinogenesis. *International Journal of Urology*, v. 17, p.801–809, 2010.

KONTOS, S. *et al.* Expression of ER β and its co-regulators p300 and NCoR in human transitional cell bladder cancer. *Urologia Internationalis*, v.87, p.151–158, 2011.

KUMAR, R. *et al.* Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Assays in Biochemistry*, v.40, p.27-39, 2004.

LANGLEY-EVANS, S.C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, v.28, p.1-14, 2015.

LEVINE, S. Primary social relationship influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, v.73, p.255-60, 2001.

LI, Y. *et al.* The role of the androgen receptor in the development and progression of bladder cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v.42, n.7, p.569-577, 2012.

LIBERMAN, A.C. *et al.* Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v.18, p.45-56, 2007.

LOKESHWAR, V. B *et al.* Bladder tumors: molecular aspects and clinical management. New York: Humana Press, 2011.

LOMBARD, A.P. & MUDRYJ, M. The emerging role of the androgen receptor in bladder cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v.22, p.265-277, 2015.

LYONS, D.M. *et al.* Postnatal foraging demands alter adrenocortical activity and psychosocial development. *Developmental Psychobiology*, v.32, p.285–291, 1998.

MARDONES, J.; SEGOVIA-RIQUELME, N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehavioral, Toxicology and Teratology*, v. 5, p. 171-178, 1983.

MARTINS, O.A. Estresse, alcoolismo e vitamina E: avaliação de parâmetros bioquímicos e morfofisiologia prostática. 2007. 100f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

MASHHADI, R. *et al.* Role of steroid hormone receptors in formation and progression of bladder carcinoma: a case–control study. *Urology Journal*, v.11, p.1968–1973, 2014.

McBETH, L. *et al.* Involvement of the androgen and glucocorticoid receptors in bladder câncer. *International Journal of Endocrinology*, 2015, In Press: [dx.doi.org/10.1155/2015/384860](https://doi.org/10.1155/2015/384860)

McEWEN, B.S. *et al.* Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, v.62, p.3-12, 2012.

MCGRATH, M. *et al.* Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, v.163, p.236-244, 2006.

MIYAMOTO, H. *et al.* Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. *Journal of the National Cancer Institute*, v.99, p.558-568, 2007.

MIYAMOTO, H. *et al.* Non-invasive papillary urothelial neoplasms: The 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathology International*, v.60, p.1-8, 2010.

MIYAMOTO, H. *et al.* Nuclear hormone receptor signals as new therapeutic targets for urothelial carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, v.12, p.14-22, 2012a.

MIYAMOTO, H. *et al.* Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the urinary bladder. *British Journal of Urology International.*, v.11, p.1716-1726, 2012b.

MUDRYJ, M. & TEPPER, C.G. On the origins of the androgen receptor low molecular weight species. *Hormones & Cancer*, v.4, p.259–269, 2013.

NAJARI, B.B. *et al.* Sex disparities in cancer mortality: the risks of being a man in the U. S. *Journal of Urology*, v.12, p.5774–5776, 2012.

NISHI, M. *et al.* Effects of early life stress on brain activity: Implications from maternal separation model in rodents. *General and Comparative Endocrinology*, v.181, p.306-309, 2013.

OVERDEVEST, J.B. *et al.* CD24 expression is important in male urothelial tumorigenesis and metastasis in mice and is androgenregulated. *PNAS*, v. 109, p. 3588-3596, 2012.

POPESKO, P. *et al.* A colour atlas of anatomy of small laboratory animals. London: Wolfe Publishing Ltd, 1992.

PRYCE, C.R. *et al.* Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. *News in Physiological Sciences*, v.17, p.150-155, 2002.

PRYCE, C.R. *et al.* Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.29, p. 649–674, 2005.

RAHMANI, A.H. *et al.* Implication of androgen receptor in urinary bladder cancer: a critical mini-review. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, v.4, p.150-155, 2013.

REIS, L.O. *et al.* Urothelial carcinogen resistance driven by stronger Toll-like receptor 2 (TLR2) and Uroplakin III (UP III) defense mechanisms: a new model. *World Journal of Urology*, v.33, p.413-419, 2014.

SCHULER, L.A. & AUGER, A.P. Psychosocially influenced cancer: diverse early-life stress experiences and links to breast cancer. *Cancer Prevention Research*, v.3, p.1365-1370, 2010.

SCOSYREV, E. *et al.* The burden of bladder cancer in men and women: analysis of the years of life lost. *British Journal of Urology International*, v.109, p.57-62, 2012.

SHEN, S.S. *et al.* Expression of estrogen receptors-a and -b in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue. *Cancer*, v.106, p.2610-2616, 2006.

SHIMADA, K. *et al.* ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BMC Urology*, v.11, p.1-12, 2011.

SIEGEL R. *et al.* Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.63, p.11-30, 2013.

SIEVERT, K.D. *et al.* Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology*, v.27, p.295-300, 2009.

STÖHR, T. *et al.* Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.67, p. 809-819, 2000.

SU, L.J. *et al.* Epigenetic contributions to the relationship between cancer and dietary intake of nutrients, bioactive food components, and environmental toxicants. *Frontiers in Genetics*, v.2, p1-12, 2011.

THAKER, P.H. *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, v.12, p.939-944, 2006.

THAKER, P.H. *et al.* The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle*, v.6, p.430-433, 2007.

TRIKHA, M. *et al.* Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clinical Cancer Research*, v.9, p.4653-4665, 2003.

TUYGUN, C. *et al.* Sex-specific hormone receptors in urothelial carcinomas of the human urinary bladder: a comparative analysis of clinicopathological features and survival outcomes according to receptor expression. *Urologic Oncology*, v.29, p.43–51, 2011.

WALKER, C.D. *et al.* Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v.29, p.364-382, 2004.

WEI, S. *et al.* Estrogen and progesterone receptor expression is not always specific for mammary and gynecologic carcinomas: a tissue microarray and pooled literature review study. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v.17, p.393–402, 2009.

WU, J.T. *et al.* Androgen receptor is a potential therapeutic target for bladder cancer. *Urology*, v.75, p.820-827, 2010

XIONG, F. & ZHANG, L. Role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.34, p.27-46, 2010.

YEMELYANOV, A. *et al.* Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. *Oncogene*, v.26, p.1885-1896, 2007.

ZHENG, Y. *et al.* Contrary regulation of bladder cancer cell proliferation and invasion by dexamethasone-mediated glucocorticoid receptor signals. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.11, p.2621-2632, 2012.