



unesp

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



EFEITOS DOS COMPLEXOS DE NÍQUEL E PLATINA
DERIVADOS DE BASE DE SCHIFF NO CÂNCER DE BEXIGA
URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

MIRIAN YOSHIKO MATSUMOTO

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

Professor Doutor Wagner José Fávaro

**BOTUCATU – SP
2017**

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DOS COMPLEXOS DE NÍQUEL E PLATINA
DERIVADOS DE BASE DE SCHIFF NO CÂNCER DE BEXIGA
URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

MIRIAN YOSHIKO MATSUMOTO

WAGNER JOSÉ FÁVARO

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

Professor Doutor Wagner José Fávaro

BOTUCATU – SP

2017

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br



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

Matsumoto, Mirian Yoshiko.

Efeitos dos complexos de níquel e platina derivados de base de Schiff no câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo / Mirian Yoshiko Matsumoto. - Botucatu, 2017.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wagner José Fávaro

Capes: 40102092

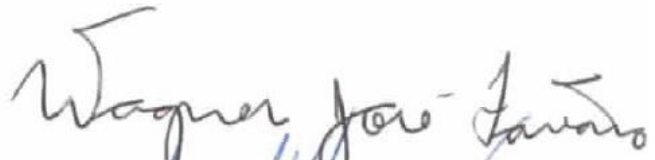
1. Bexiga - Câncer - Tratamento. 2. Níquel. 3. Platina. 4. Schiff, Bases de. 5. Nanotecnologia.

Palavras-chave: Base de Schiff; Câncer de bexiga; Carreador lipídico nanoestruturado; Níquel; Platina.

Botucatu, 30 de maio de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. WAGNER JOSÉ FÁVARO



Prof. Dr. MURILO VIEIRA GERALDO



Profa. Dra. CINTIA YURI MATSUMURA



Prof. Dr. FLAVIO DE OLIVEIRA LIMA



Prof. Dr. DIEGO STEFANI TEODORO MARTINEZ



Dedico e agradeço especialmente:

Ao nosso poderoso Senhor Deus, bondoso e misericordioso, que tudo sabe e, em sua perfeição sempre me concede o melhor, me conduzindo por caminhos que permitem meu crescimento profissional, pessoal e espiritual.

Ao Senhor Jesus Cristo, nosso mestre, salvador, redentor, melhor exemplo de bondade e amor ao próximo a ser seguido.

À minha família, minha fortaleza, fonte de felicidade, amor e inspiração:

Ao meu pai Mario, que apesar de todas as dificuldades enfrentadas se tornou um grande exemplo de força, luta e conquistas e por sempre me incentivar, não medindo esforços para que eu alcance meus objetivos;

À minha mãe Teresa, por todo amor que nos dedica e sempre colocar a família acima de tudo, não importa o que aconteça;

À minha irmã Marcia, por ser a pessoa mais generosa que conheço, sempre disposta a ajudar e sem esperar nada em troca.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Wagner pela oportunidade, orientação, por fornecer todos os recursos necessários para o desenvolvimento de pesquisas de alta qualidade, por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis, por deixar as portas do seu laboratório sempre abertas e nunca negar ajuda aos que precisam.

Aos Professores Doutores Andrelson e Nelson Domingues pela ideia do projeto e por todo suporte no início do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Doutor Nelson Durán, mentor de uma etapa deste projeto, pelo espaço disponibilizado em seu laboratório.

Ao Professor Doutor Sérgio Felisbino e a Professora Doutora Flávia Delella pela acolhida no LabMec durante minha estadia em Botucatu.

Aos professores membros da Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação: Professores Doutores Luiz Gustavo Chuffa, Robson Carvalho e Valber Pedrosa pelas correções e contribuições com este trabalho.

Aos professores membros da Comissão Examinadora da Defesa de Tese: Professores Doutores Cintia Matsumura, Diego Stéfani, Flávio Lima e Murilo Geraldo pelo aceite do convite e disponibilidade de tempo.

A todos os funcionários dos Departamentos de Morfologia e Anatomia e aos secretários da seção de Pós-Graduação da UNESP de Botucatu pelo profissionalismo e competência.

Aos amigos Ana Claudia, Érica e Antonio pela amizade e companheirismo em nossa trajetória de Dourados à Campinas e por sempre estarem ao meu lado, compartilhando alegrias e momentos difíceis.

Aos colegas e agora amigos Joel e Patrick por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelos bons exemplos de generosidade e boa convivência.

Aos amigos do LCURGIM: Bia, Bruno, Eduardo, João Pedro, Lara, Lívia e Petra pelos momentos de alegrias e frustrações compartilhados. Agradeço também a todos os membros do laboratório: Amanda, Alexandre F., Alexandre M., Dominic, Jú Vecina, Leticia, Luiz Affonso, Máisa, Marcão, Marcela, Mari, Melody, Natasha, Olga, Paloma, Paulo e Queila pelo companheirismo.

Aos colegas do Departamento de Anatomia da UNICAMP: Bruna, Camila, Catha, Elisa, Jéssica e Júnior pelos bons momentos de descontração durante os intervalos dos experimentos.

Aos funcionários dos Institutos de Biologia e Química da UNICAMP: Alexandra M. Ferraz, Anderson e Gustavo (RMN), Chico, Cláudia Martelli, Dona Fátima, Dona Raquel, Marquinho, Nori, Paulo, Pereira e Walter pela atenção e paciência.

Ao Manoel pelos testes *in vitro*, ao Luiz Bandeira pelas análises de NTA e a Alzira pelos conhecimentos compartilhados durante o desenvolvimento das nanopartículas, a ajuda de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos professores da Pontifícia Universidade Católica de Campinas Edmilson Gonçalves e Míriam Nunes por permitirem a realização do Estágio Docência.

Ao veterinário Rodrigo Ometto que, apesar dos muitos compromissos sempre disponibilizou tempo quando solicitado, agradeço seu profissionalismo e competência durante a realização das análises de ultrassom.

As minhas colegas de moradia de Botucatu: Pati e Jaque e também de Campinas: Alice, Bruna B., Bruna P., Dani, Ingrid, Lary e Naty. Obrigada por

serem a minha família e tornarem minha estadia mais agradável no estado de São Paulo.

Aos membros da minha família, que sempre estiveram comigo e de uma alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, agradeço a todos pelo apoio e torcida.

Aos animais experimentais que fizeram parte desta pesquisa, os quais desejo sempre o bem-estar e espero ter sido respeitosa o suficiente com suas vidas.

À Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" pela minha formação, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela oportunidade, à Universidade Estadual de Campinas e ao Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia por permitirem o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa (processo nº 2013/04708-8) e pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, mas não menos importante, me apoiaram durante esta etapa da minha vida.

Agradeço sinceramente a todos, Deus os abençoe!

Havia um homem que costumava ter em cima de sua cama uma placa escrita:

ISSO TAMBÉM PASSA!

Perguntaram a ele o motivo... Ele disse que era para que quando estivesse passando por momentos ruins, lembrar-se de que eles iriam embora, que iriam passar, e que ele estava vivendo aquilo por algum motivo. Mas a placa também era para lembrá-lo de que quando estivesse muito feliz, ele não deveria deixar tudo para trás e se deixar levar, porque esses momentos de euforia também iriam passar, e momentos difíceis viriam novamente.

Todas as coisas na Terra passam.

Os dias de dificuldades passarão.

Passarão também os dias de amargura e solidão.

As dores e as lágrimas passarão.

As frustrações que nos fazem chorar, um dia passarão.

A saudade do ser querido que se vai, na mão da morte, passará.

Os dias de glórias e triunfos mundanos, em que nos julgamos maiores e melhores que os outros, igualmente passarão.

A vaidade interna, que nos faz sentir como o centro do universo, um dia passará.

A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando que ela nem sempre segue o nosso querer, mas é perfeita naquilo que tem que ser.

(Chico Xavier)

"Em tudo que fizer, faça sempre o melhor, busque a perfeição mesmo sabendo que jamais a encontrará, seja honesto, orgulhe-se de seus feitos, e jamais espere o reconhecimento de ninguém".

(Zu Kawaguchi)

LISTA DE ABREVIATURAS

- Akt:** Proteína quinase B
- BCG:** Bacillus Calmette-Guérin
- BS:** Base de Schiff
- BSA:** Albumina do Soro Bovino
- CB:** Câncer de Bexiga
- CBNMI:** Câncer de bexiga não músculo-invasivo
- CDCl₃:** Clorofórmio deuterado
- CHN:** Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
- CLN:** Carreador lipídico nanoestruturado
- d:** Duplete
- DAB:** Diaminobenzidina
- DLS:** Espalhamento Dinâmico de Luz
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DTG:** Termogravimetria Derivada
- EE:** Eficiência de Encapsulação
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- FTIR:** Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
- K₂PtCl₄:** Tetracloroplatinato de potássio (II)
- L:M:** Ligante: Metal
- LMC:** Leucemia mielóide crônica
- m:** Multiplete
- MDR:** Resistente a Múltiplas Drogas
- MNU:** *N*-metil-*N*-nitrosouréia
- v:** Frequência
- Ni:** Níquel
- NiCl₂:** Cloreto de níquel
- nm:** Nanômetro
- NOX:** NADPH oxidase
- NTA:** Análise de Rastreamento de Nanopartículas
- PDI:** Índice de polidispersividade
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinase
- ppm:** Partes por milhão

Pt: Platina

PTEN: Fosfatase Homóloga a Tensina

RMN de ^1H e ^{13}C : Medidas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono

rpm: Rotação por minuto

RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute

RTU: Ressecção transuretral

s: Singleto

Salan: *N*-Salicilideno anilina

Salan(Ni): *N*-Salicilideno anilina(níquel)

Salan(Pt): *N*-Salicilideno anilina(platina)

t: Tripleto

TBS-T: Tampão Salino de Tris com Tween 20

TG: Termogravimetria

UFC: Unidades formadoras de colônias

UP: Uroplaquina

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

WB: *Western blotting*

RESUMO: O câncer de bexiga (CB) é a segunda malignidade geniturinária mais comum. A maioria (75%) dos CBs são primeiramente diagnosticados como não-músculo invasivos (CBNMIs) nos estádios Ta, T1, e carcinoma *in situ* (CIS). Atualmente, o tratamento mais utilizado contra CBNMIs envolve a imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) associada à ressecção transuretral (RTU). No entanto, a utilização de BCG pode causar graves efeitos colaterais e está associada com uma elevada taxa de recorrência após o tratamento. Por conseguinte, várias abordagens têm sido investigadas, incluindo o desenvolvimento de novas moléculas, assim como a melhoria da terapia com medicamentos convencionalmente utilizados no tratamento de tumores e a incorporação de sistemas de carregamento de fármacos. Considerando o uso de novas moléculas, complexos metálicos derivados de bases de Schiff (BSs) são compostos versáteis que apresentam atividade antitumoral, fornecendo assim novas perspectivas para a terapia do CBNMI. Em relação ao carregamento de fármacos, ao longo dos últimos anos, carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) têm atraído considerável interesse como veículos alternativos para produtos farmacêuticos antitumorais. Assim, com o intuito de adquirir maior conhecimento a respeito da química dos complexos derivados da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan) e também seus efeitos na progressão do CBNMI, esta tese descreve a síntese e caracterização de complexos *N*-Salicilideno anilina(níquel) [Salan(Ni)] e *N*-Salicilideno anilina(platina) [Salan(Pt)]. A estrutura proposta desses compostos foi estabelecida por análise elementar (CHN), FTIR, TG, RMN de ^1H e ^{13}C . As atividades citotóxicas dos compostos sintetizados [Salan, NiCl_2 e Salan(Ni)] foram avaliadas por ensaio MTT e os dados obtidos indicaram que Salan(Ni) demonstrou atividade citotóxica significativa contra linhagens celulares de leucemia e câncer de fígado. Além disso, neste estudo os efeitos histopatológicos e moleculares dos compostos sintetizados [Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt)] foram caracterizados e comparados com o tratamento com BCG em um modelo animal de CBNMI. Os resultados obtidos indicaram que o grupo Salan(Ni): apresentou melhor recuperação histopatológica quando comparado ao grupo Câncer; aumentou os níveis da proteína UPIII; aumentou a expressão dos genes supressores de tumor PTEN e p53; causou inibição da angiogênese devido aos níveis proteicos elevados de endostatina e níveis mais baixos da proteína VEGF. No entanto, durante a instilação dos tratamentos, observou-se a precipitação dos compostos. Então, testes utilizando 2% de DMSO em óleo de milho como veículo para complexos do tipo Salan [Salan(Ni) e Salan(Pt)] foram realizados. Adicionalmente, o complexo Salan(Pt) foi incorporado a um carreador lipídico nanoestruturado (CLN) derivado de murumuru. O CLN carregado com Salan(Pt) [Salan(Pt)-CLN] foi preparado através do sistema de agitação mecânica e apresentou diâmetro médio de

MATSUMOTO, M. Y. Tese de Doutorado em Biologia Geral e Aplicada – UNESP – Botucatu

165,4 nm e potencial zeta -34,4 mV. Por fim, os compostos obtidos [Salan(Ni), Salan(Pt), CLN livre, Salan(Pt)-CLN] foram administrados *in vivo* para avaliar seus efeitos contra CBNMI. A análise histológica revelou que o grupo Salan(Ni) apresentou melhor recuperação histopatológica. Análises de *Western blotting* (WB) indicaram que os tratamentos com Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN provavelmente ativam a via p53 diminuindo os níveis proteicos de Akt e PI3K. Em conclusão, os resultados indicaram que o complexo Salan(Ni) apresentou melhores efeitos na redução da agressividade do CBNMI comparado aos demais complexos e BCG.

Palavras-chave: Base de Schiff; Câncer de bexiga; Carreador lipídico nanoestruturado; Níquel; Platina.

ABSTRACT: Bladder cancer (BC) is the second most common genitourinary malignancy. Most (75%) BCs are non-muscle invasive (NMIBC) at first diagnosis [Ta, T1, and carcinoma *in situ* (CIS)]. Currently, the most used treatment against NMIBC involves the immunotherapy with BCG (Bacillus Calmette-Guérin) associated with the transurethral resection. However, the use of BCG can cause severe side effects and it is associated with high recurrence rate after treatment. Therefore, several approaches have been investigated, including the development of new molecules and also the improvement of the therapy with drugs conventionally used to treat cancers by using drug delivery systems. Considering the use of new molecules, metal complexes derived from Schiff bases (SBs) are versatile molecules with anticancer activity, providing new perspectives for the therapy of NMIBC. Regarding the drug delivery, over the past few years, nanostructured lipid carriers (NLCs) have been attracting considerable interest as alternative carriers for anticancer pharmaceuticals. Thus, in order to acquire more information about the chemistry of the complexes derived from the SB of *N*-Salicylidene aniline (Salan), as well as its effects on the progression of NMIBC, the present thesis describes the synthesis and characterization of *N*-Salicylidene aniline(nickel) [Salan(Ni)] and *N*-Salicylidene aniline(platinum) [Salan(Pt)] complexes. The proposed structure of these compounds was established by elemental analysis (CHN), FTIR, TG, ¹H and ¹³C NMR. Cytotoxic activities of the synthesized compounds [Salan, NiCl₂ and Salan(Ni)] were evaluated by the MTT assay and the obtained data indicated that Salan(Ni) showed significant cytotoxic activity against leukemia and liver cancer cells lines. Furthermore, in this study the histopathological and molecular effects of the synthesized compounds [Salan, Salan(Ni) and Salan(Pt)] were characterized and compared with BCG treatment in an animal model of NMIBC. Our results demonstrated that the Salan(Ni) group: improved histopathological recovery when compared with Cancer group; increased UPIII protein levels; increased expression of tumor suppressors genes PTEN and p53; inhibited of angiogenesis assigned to elevated levels of endostatin and lower levels of VEGF. However, during the instillation of treatments, compounds precipitation were observed. Then, tests using 2% DMSO in corn oil as vehicle for Salan-type complexes [Salan(Ni) and Salan(Pt)] were performed. Additionally, Salan(Pt) complex was incorporated into nanostructured lipid carrier (NLC) derived from murumuru. The NLC loaded with Salan(Pt) [Salan(Pt)-NLC] was prepared by using mechanical agitation method and had an average diameter of 165,4 nm as well as zeta potential of -34,4 mV. Ultimately, the obtained compounds [Salan(Ni), Salan(Pt), free NLC, Salan(Pt)-NLC] were administered *in vivo* to evaluate their effects against NMIBC. The histological analysis revealed that Salan(Ni) group

showed better histopathological recovery. Western blotting (WB) analysis indicated that Salan(Ni), Salan(Pt) and Salan(Pt)-NLC treatments probably activate the p53 pathway by decreasing the protein levels of Akt and PI3K. In conclusion, the results showed the Salan(Ni) has better effects in reduction of NMIBC aggressiveness compared to the other complexes and BCG.

Keywords: Schiff base; Bladder cancer; Nanostructured lipid carrier; Nickel; Platinum.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Anatomia e estrutura da bexiga urinária.....	18
1.2. Câncer de bexiga.....	21
1.2.1. CBNMI: enzima formadora de espécies reativas de oxigênio (NOX), vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (Akt, PI3K, p53 e PTEN), balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e endostatina).....	26
1.3. Imunoterapia intravesical com <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> (BCG).....	29
1.4. Atividade antitumoral de complexos metálicos.....	33
1.4.1. Complexos metálicos derivados de bases de Schiff.....	36
1.5. Nanopartículas lipídicas na terapia intravesical.....	39
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Objetivo geral.....	47
3.2. Objetivos específicos.....	47
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Capítulo I: Síntese, Caracterização do Novo Complexo <i>N</i> -Salicilideno Anilina(platina) e Atividade Antitumoral <i>in vitro</i> do Complexo <i>N</i> -Salicilideno Anilina(níquel) Derivados de Base de Schiff.....	50
4.2. Capítulo II: Avaliação dos Efeitos da Administração Intravesical de Complexos Derivados da Base de Schiff <i>N</i> -Salicilideno Anilina na Progressão do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI).....	80
4.3. Capítulo III: Novas Terapias Baseadas em Complexos Tipo Salan Lipofílicos e Carreador Lipídico Nanoestruturado para o Tratamento do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI).....	108
5. CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS.....	147
ANEXO I.....	161
ANEXO II.....	162
ANEXO III.....	163
ANEXO IV.....	164

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia e estrutura da bexiga urinária

De acordo com Mahadevan (2016) o trato urinário é dividido em duas partes: trato urinário superior e trato urinário inferior. O trato urinário superior compreende os rins e os ureteres, enquanto o trato urinário inferior consiste da bexiga urinária e da uretra, em ambos os sexos (Figura 1) (Alleemudder & Ballaro, 2016; Mahadevan, 2016). É convencional considerar a próstata e as vesículas seminais como parte do trato urinário inferior nos homens (Figura 1a), pois estão tanto topograficamente quanto funcionalmente relacionadas à uretra e à bexiga (Mahadevan, 2016). O trato urinário inferior possui duas funções importantes: o armazenamento e a expulsão voluntária da urina que recebe do trato urinário superior, sendo que bexiga urinária atua como um reservatório temporário e gera pressão suficiente para ajudar na expulsão da urina (Andersson & Arner, 2004; Mangera *et al.*, 2013).

A bexiga urinária é um órgão oco, muscular e distensível (Mahadevan, 2016; Mangera *et al.*, 2013). Em adultos, a bexiga vazia assume a forma de um tetraedro achatado (pirâmide tridimensional), possui um ápice que liga o úraco à parede abdominal anterior, ocupa uma posição totalmente extraperitoneal, na parte anterior da cavidade pélvica e atrás da sínfise púbica (Alleemudder & Ballaro, 2016; Mahadevan, 2016; Mangera *et al.*, 2013). À medida que a bexiga se distende, expande-se superiormente para o abdome e torna-se oval (Alleemudder & Ballaro, 2016; Drake *et al.*, 2005; Mahadevan, 2016; Mangera *et al.*, 2013).

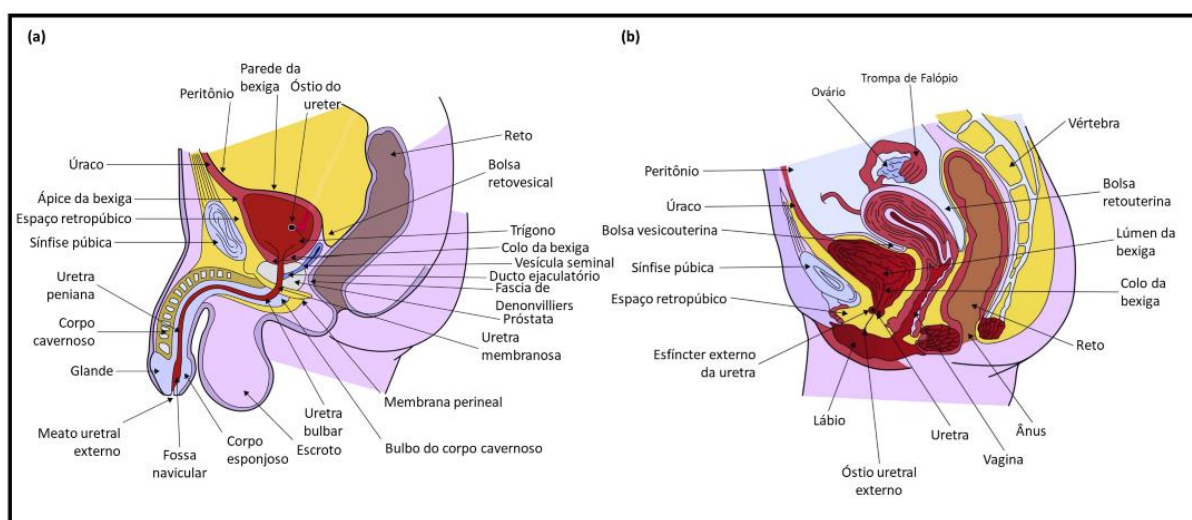


Figura 1: Corte sagital mediano da pelve masculina representando o trato urinário inferior (a) e corte sagital mediano da pelve feminina representando o trato urinário inferior (b). Fonte: Mangera *et al.* (2013).

Anatomicamente, a bexiga urinária pode ser dividida em dois componentes principais (Figura 2a): o corpo é a maior porção da bexiga e está localizado acima dos óstios dos ureteres; e a base que consiste do trígono (região triangular entre os óstios dos ureteres e a uretra) e do colo da bexiga (é a parte mais inferior e “fixa” da bexiga) (Andersson & Arner, 2004; Drake *et al.*, 2005; Sun, 2006). Drake *et al.* (2005) ainda relatam que a superfície superior da bexiga possui uma cúpula discreta quando a bexiga está vazia e faz um abaulamento para cima quando a bexiga enche.

Histologicamente, a parede da bexiga é formada por quatro camadas (Mahadevan, 2016) e na Figura 2b estão representadas as principais. Nomeadas do meio interno para o externo: a primeira camada, a mucosa ou urotélio, reveste o interior da bexiga ou lúmen, é composta por epitélio transicional e sua principal função é formar uma barreira de permeabilidade da bexiga (GuhaSarkar & Banerjee, 2010; Hsu & King, 2012; Mangera *et al.*, 2013; Wong-You-Cheong *et al.*, 2006); a segunda camada, a lâmina própria ou submucosa, é constituída por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, contém uma rede de vasos sanguíneos, nervos e células intersticiais que em conjunto formam uma estrutura sensível ao preenchimento da bexiga (Fry, 2013; Mangera *et al.*, 2013; Wong-You-Cheong *et al.*, 2006); a terceira camada, a muscular própria ou músculo detrusor, é constituída por fibras musculares lisas que formam feixes sem orientação definida, o que permite que o detrusor possa contrair-se harmonicamente, comprimindo a urina em direção à uretra proximal durante a micção (Júnior *et al.*, 2010; Mangera *et al.*, 2013; Wong-You-Cheong *et al.*, 2006); a quarta e última camada, a adventícia é formada por tecido conjuntivo adiposo e separa a bexiga dos órgãos adjacentes (Hamilton, 1982; Mahadevan, 2016; Mangera *et al.*, 2013; Wong-You-Cheong *et al.*, 2006).

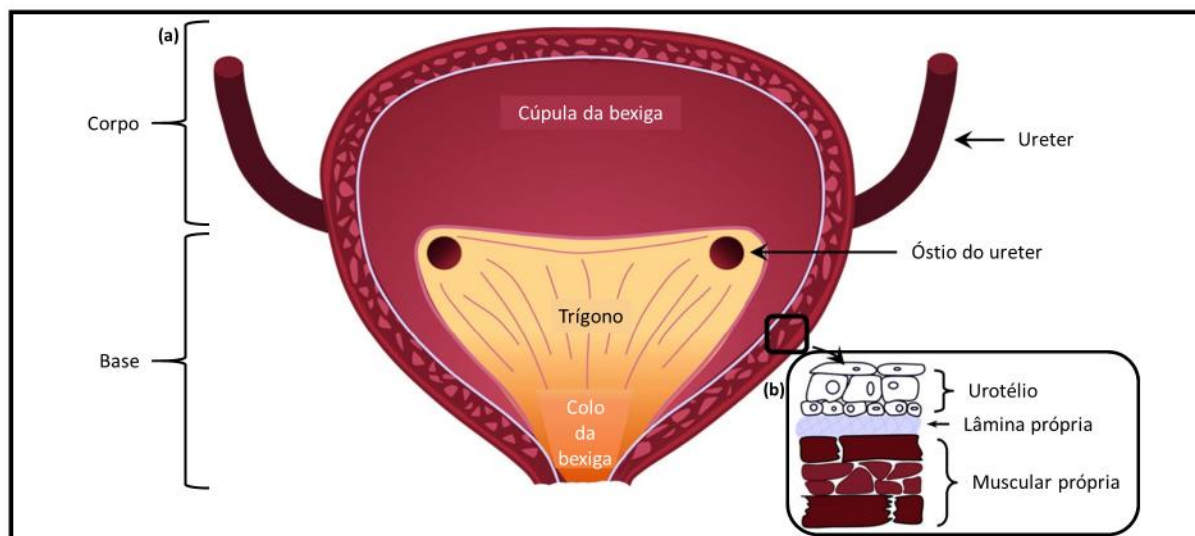


Figura 2: Diagrama da bexiga urinária (a) e secção transversal da parede da bexiga (b). Fonte: Fry (2013).

No urotélio existem três tipos diferentes de células: as células basais, as células intermediárias e as células em guarda-chuva (Alleemudder & Ballaro, 2016; GuhaSarkar & Banerjee, 2010; Hsu & King, 2012). Essas células são flexíveis e podem mudar da forma cuboidal para achatada à medida que a bexiga se distende (Wong-You-Cheong *et al.*, 2006). Esses três tipos de células diferem em suas morfologias: as células basais germinativas possuem diâmetros de 5-10 μm , as células intermediárias possuem diâmetro de 20 μm e as células em guarda-chuva podem ter diâmetros variando de 50-120 μm dependendo do grau de estiramento da bexiga (Hsu & King, 2012; GuhaSarkar & Banerjee, 2010).

A superfície da membrana apical das células superficiais uroteliais é composta por proteínas específicas chamadas uroplaquinas (UPs) (Kerec *et al.*, 2005). As UPs estão organizadas em placas que são muito mais espessas do que a região da membrana normal (Kerec *et al.*, 2005). As UPs são responsáveis pelo bloqueio da passagem da maior parte de água e uréia através do urotélio, constituindo a segunda barreira do urotélio à passagem de substâncias da urina para o sangue (Fraser *et al.*, 2002).

Até pouco tempo atrás o urotélio era considerado apenas uma barreira protetora para o interstício da bexiga, pois funciona para impedir metabólitos urinários de interagirem com a camada de músculo ou de serem reabsorvidos pela corrente sanguínea, contrabalançando a função dos rins (Parsons, 2010). No entanto, outras funções são cada vez mais reconhecidas, como seu papel no carcinoma de bexiga que se forma a partir das células transicionais do urotélio (Chen *et al.*, 2015; Mangera *et al.*, 2013).

1.2. Câncer de bexiga

Doenças da bexiga urinária são responsáveis por um grande número de casos médicos graves e uma das principais doenças que afeta a bexiga urinária é o câncer de bexiga (CB) (GuhaSarkar & Banerjee, 2010). Mais de 90% dos casos de CB consistem em carcinomas de células transicionais (carcinomas uroteliais), 5% compreendem os carcinomas de células escamosas e menos de 2% constituem os adenocarcinomas (Chen *et al.*, 2015; Kaufman *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2001). O carcinoma urotelial é um câncer no qual células anormais do revestimento epitelial se multiplicam sem controle, o carcinoma de células escamosas origina-se a partir de células escamosas como resultado de inflamações crônicas da bexiga e o adenocarcinoma forma-se a partir das células que compõem as glândulas (Chen *et al.*, 2015; Hsu & King, 2012).

O CB é a segunda malignidade geniturinária mais comum, é o quarto tipo de câncer mais frequente em homens, o 11º mais frequente em mulheres e a 13ª maior causa de morte por câncer em todo o mundo (Dobruich *et al.*, 2016; Kamat *et al.*, 2016; Kirkali *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2001). Embora o CB afete mais homens que mulheres, o prognóstico do CB em homens é melhor do que em mulheres, sendo que no sexo feminino existem ainda maiores riscos de recidiva, progressão e mortalidade após o tratamento (Dobruich *et al.*, 2016; Shariat *et al.*, 2010). Mais de 60% de todos os casos de CB e metade de todas as 165.000 mortes por CB ocorrem nas regiões menos desenvolvidas do mundo (Antoni *et al.*, 2017). Em razão dessa frequência e da natureza recidivante da doença, o CB representa um alto custo para os sistemas de saúde (Burger *et al.*, 2013).

No Brasil, a estimativa de casos de CB em 2016 foi de 7.200 em homens e 2.470 em mulheres (INCA, 2017). Ainda de acordo com o INCA (2017), sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o CB em homens é o quinto mais comum na Região Norte (4,32/100 mil), sexto na Região Sudeste (10,05/100 mil), sétimo na Região Centro-Oeste (5,63/100 mil), nono na Região Sul (9,36/100 mil) e 11º na Região Nordeste (3,33/100 mil). Em mulheres, é o 13º mais frequente nas Regiões Centro-Oeste (2,53/ 100 mil) e Norte (0,76/ 100 mil), 14º nas Regiões Sul (3,63/100 mil), Sudeste (2,95/100 mil) e Nordeste (1,36/100 mil) (INCA, 2017).

Muitos fatores estão associados à incidência do CB, de maneira que a maioria dos casos surge após exposições excessivas e prolongadas a carcinógenos exógenos que caem na circulação sanguínea por inalação, ingestão ou contato com a pele (Cumberbatch *et al.*, 2015; Hsu & King, 2012; Kaufman *et al.*, 2009). Burger *et al.* (2013) classificaram os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CB em: suscetibilidade genética; tabagismo; risco

ocupacional; fatores dietéticos; poluição ambiental; gênero, raça, nível socioeconômico e condições médicas (causa direta ou como efeito colateral do tratamento). A incidência de CB também aumenta à medida que a população envelhece, chegando ao ápice entre os 50 e 70 anos (Kaufman *et al.*, 2009; Pashos *et al.*, 2002).

Estima-se que o tabagismo seja a causa de 50% a 66% dos CBs, devido a certos produtos químicos presentes nos cigarros, como os compostos *N*-nitrosos (Brennan *et al.*, 2000; Burger *et al.*; 2013; Hsu & King, 2012; Pashos *et al.*, 2002). Aproximadamente 25% dos CBs estão relacionados a exposições a alguns agentes carcinogênicos no local de trabalho, como a benzidina e aminas aromáticas (benzidina, 4-aminobifenil, 2-naftilamina, 4-cloro-*o*-toluidina), principalmente em áreas industriais de processamento de tintas, pigmentos, couros, metais e derivados de petróleo (Burger *et al.*; 2013; Hsu & King, 2012; Kogevinas *et al.*, 2003; Pashos *et al.*, 2002). Outras exposições associadas ao aumento do risco nessas ocupações e indústrias incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), hidrocarbonetos clorados e outros solventes (Kogevinas *et al.*, 2003). Hsu & King (2012) ainda citam que carnes salgadas e assadas também podem estar associadas com a tumorigênese da bexiga, uma vez que esses alimentos contêm carcinógenos como os compostos *N*-nitrosos e aminas heterocíclicas.

Em 1998 a OMS (Organização Mundial da Saúde) e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica classificaram os tumores uroteliais em quatro categorias: papiloma, neoplasia papilar urotelial de baixo potencial maligno, carcinoma de baixo grau e carcinoma de alto grau (Kaufman *et al.*, 2009). O estadiamento histológico (Tabela 1) é feito pelo sistema de estadiamento TNM (tumor-nódulo-metastase), no qual o T (estádio tumoral) do tumor primário é baseado no grau de invasão na parede da bexiga (Kaufman *et al.*, 2009; Pashos *et al.*, 2002).

Tabela 1: Estadiamento do Câncer de bexiga.

Estádio	Descrição
Câncer de bexiga superficial:	
Ta	Tumor papilar confinado ao urotélio e projetado em direção ao lúmen (carcinoma papilar não invasivo);
T1	Tumor papilar que invade a lâmina própria subjacente (o tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial);
Tis	Lesão plana, apresenta características histológicas de alto grau e confinadas ao urotélio (carcinoma <i>in situ</i> ou CIS).
Câncer de bexiga invasivo:	
T2	T2a: o tumor invade a metade interna da camada de músculo detrusor, T2b: o tumor invade a metade externa da camada de músculo detrusor;
T3	T3a: Tumor invade microscopicamente a camada de tecido conjuntivo adiposo, T3b: Tumor invade macroscopicamente a camada de tecido conjuntivo adiposo (formando uma massa extravascular);
T4	T4a: o tumor invade a próstata, o útero ou a vagina, T4b: o tumor invade a parede pélvica ou abdominal;
N+	o tumor invade um linfonodo local;
M+	o tumor espalha-se (metástase) e progride para um órgão distante.

Fonte: Pashos *et al.* (2002).

O CB não-músculo invasivo (CBNMI) ou superficial é definido como um tumor confinado às duas primeiras camadas de tecido da bexiga, ou seja, ao urotélio e à lâmina própria (Pashos *et al.*, 2002). O tumor superficial que se projeta em direção ao lúmen é classificado como papilar (Hsu & King, 2012; Pashos *et al.*, 2002). O carcinoma plano *in situ* encontra-se confinado às camadas celulares e não se projeta para a luz da bexiga, mas apresenta maior risco de progredir e se tornar invasivo (Pashos *et al.*, 2002). Uma vez que o CB invade a camada de músculo detrusor e além (estádio T2a ou mais avançado), é diagnosticado como músculo-invasivo (CBMI) ou invasivo (Pashos *et al.*, 2002; Wong-You-Cheong *et al.*; 2006). Na Figura 3 estão representados os principais estádios do CB superficiais e invasivos.

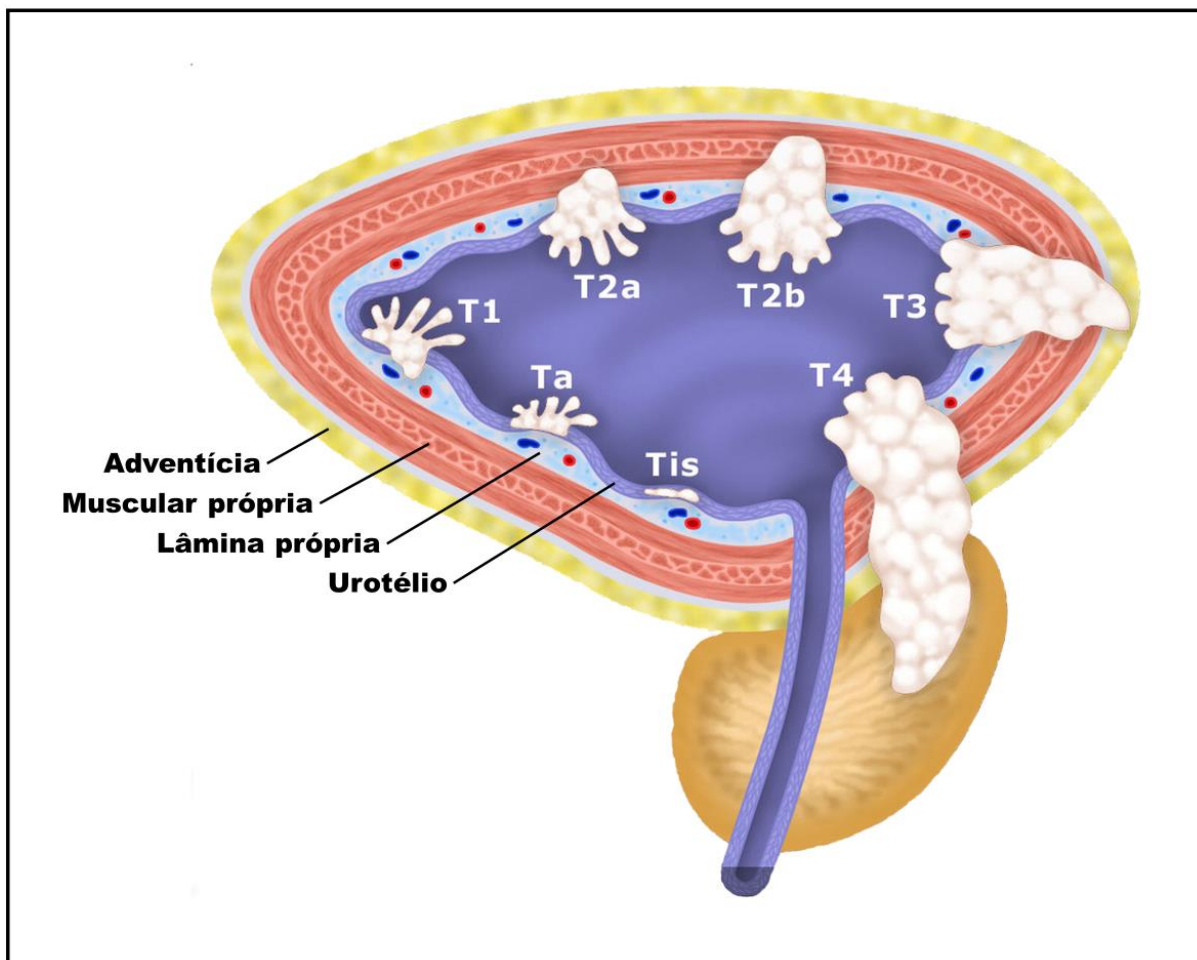


Figura 3: Diagrama representativo dos estádios da invasão tumoral na parede da bexiga urinária. Fonte: Wong-You-Cheong *et al.* (2006).

Aproximadamente 75% dos casos de CB são inicialmente diagnosticados como CBNMIs e geralmente apresentam bons prognósticos (Burger *et al.*, 2013; Rhijn *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Um terço dos CBNMIs de alto grau pode evoluir para CBMIs ou metástases e representam cerca de 25% dos casos de CB (Burger *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014).

Entre o grupo diagnosticado com CBNMI, aproximadamente 70% dos casos apresentam-se como lesões Ta, 20% como lesões T1 e 10% como carcinoma *in situ* (Epstein *et al.*, 1998; Kirkali *et al.*, 2005; Ro *et al.*, 1992). De 20% a 30% dos CBNMIs de alto grau progridem para CBMI ou metástase e aproximadamente 70% apresentam recorrência pós-tratamento exclusivo com ressecção transuretral (RTU) (Askeland *et al.*, 2012; Kemp *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2014). A sobrevida livre de recorrência em 5 anos para os estágios T2, T3 e T4 é de 89%, 62% e 50%, respectivamente (Zhou *et al.*, 2014).

Pashos *et al.* (2002) descrevem que os tumores também podem ser classificados de acordo com suas características celulares (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação patológica do Câncer de bexiga.

Grau	Descrição
I	Os tumores são bem diferenciados, possuem uma arquitetura papilar, cromatina fina e nucléolos ou mitoses imperceptíveis.
II	Os tumores são moderadamente diferenciados, geralmente possuem arquitetura papilar, cromatina granular e nucléolos e mitoses mais perceptíveis.
III	Os tumores são pouco diferenciados, menos propensos a apresentarem uma arquitetura papilar, possuem cromatina grosseira e nucléolos e mitoses bem perceptíveis.

Fonte: Pashos *et al.* (2002).

O tratamento primário do CBNMI baseia-se em cirurgia através da RTU (Askeland *et al.*, 2012). A RTU é utilizada para remover o tumor e para obter uma amostra de biópsia, que é então estadiada, classificada e avaliada para outros aspectos clínicos (Pashos *et al.*, 2002). Pashos *et al.* (2002) ainda relatam que pacientes que apresentam CB com baixo risco de progressão (isto é, estágio Ta baixo grau) tipicamente podem ser tratados com sucesso somente com RTU. Em pacientes com tumores de alto risco (ou seja, tumores Ta e T1 de estádios superiores ou tumores T1 de alto grau que persistiram ou reapareceram após o tratamento intravesical inicial) é seguida por imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Askeland *et al.*, 2012).

Para o carcinoma *in situ*, o tratamento padrão amplamente aceito é a imunoterapia com BCG intravesical (Donin *et al.*, 2017). Se houver o risco de reações adversas que impeçam o uso de BCG para o estágio Tis, a terapêutica com mitomicina C intravesical pode ser tentada em seu lugar (Pashos *et al.* 2002). Para os estádios de CBMI a forma mais viável de tratamento é a cistectomia transuretral, seja por remoção de toda a bexiga ou ressecção parcial, seguida de desvio urinário, ou radioterapia, mas muitas vezes ainda têm resultados ruins apesar da terapia sistêmica (Burger *et al.*, 2013). Os adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas possuem regimes de tratamento semelhantes, mas são muito menos sensíveis à quimioterapia e mais susceptíveis de se tornarem invasivos (GuhaSarkar & Banerjee, 2010).

Kaufman *et al.* (2009) descrevem que as complicações gerais do tratamento intravesical são sintomas de micção irritativa tais como frequência, urgência e disúria e o desenvolvimento a longo prazo de fibrose de bexiga e contratura. Kaufman *et al.* (2009) relatam ainda que os fármacos quimioterapêuticos intravesicais podem produzir outros efeitos secundários, tais como mielossupressão causada por tiotepa, descamação da pele e erupção cutânea causadas por mitomicina C, perturbações gastrointestinais e erupção cutânea causada por doxorubicina.

1.2.1. CBNMI: enzima formadora de espécies reativas de oxigênio (NOX), vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (Akt, PI3K, p53 e PTEN), balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e endostatina)

Uma combinação de vários marcadores pode ser útil na avaliação dos carcinomas uroteliais como o CB e esforços generalizados têm sido feitos para identificar marcadores que predizem a recidiva e a progressão da doença, a resposta ao tratamento e sobrevida (Hayashi *et al.*, 2011; Malats *et al.*, 2005).

Assim, é importante avaliar o papel das EROs (espécies reativas de oxigênio), pois as células tumorais são caracterizadas por níveis elevados de estresse oxidativo, o qual é exercido por EROs (Gorrini *et al.*, 2013). EROs são moléculas altamente instáveis e reativas, sendo que existem dois tipos de EROs: os radicais livres de oxigênio e os não-radicalares (Elsbach & Weiss, 1983; Gupta *et al.*, 2012). Os radicais livres de oxigênio contêm um elétron não emparelhado no seu orbital mais externo e essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares como proteínas, DNA e lipídios (Brown-Borg *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2012). Os não-radicalares não possuem elétrons desemparelhados, mas são quimicamente reativos e podem ser convertidos em radicais livres de oxigênio (Gupta *et al.*, 2012). EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (Eblin *et al.*, 2008).

NADPH oxidase (NOX) é considerada uma das principais fontes de EROs celular (Shimada *et al.*, 2011). A redução do oxigênio molecular dependente da NOX é responsável por gerar EROs na célula, na forma de O_2^- , o qual é dismutado para formar H_2O_2 (Khandrika *et al.*, 2009). Ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH \cdot) são os EROs mais bem estudados e comuns no câncer (Khandrika *et al.*, 2009). Elevadas quantidades de H_2O_2 são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumorais (Segal & Shatwell, 1997). Gupta *et al.* (2012) relatam que EROs também controlam a expressão de vários genes supressores de tumor, incluindo p53 e PTEN.

p53 tem sido o marcador molecular mais amplamente investigado no CB, pois tem um papel fundamental no controle da proliferação celular, apoptose, e estabilidade genética (Malats *et al.*, 2005). A proteína supressora de tumor p53 é codificada pelo gene *TP53*, importante no controle do ciclo celular no carcinoma urotelial (Mitra *et al.*, 2006). O gene supressor de tumor *TP53* regula a expressão de genes envolvidos na detenção do ciclo celular, apoptose, reparação de danos do DNA e oncogenes superexpressos (Dong *et al.*, 2009; Toledo

& Wahl, 2006). O estágio de CB pTis e tumores invasivos frequentemente apresentam alterações nos genes e vias *TP53* (Mitra *et al.*, 2006). Mutações no gene *TP53* têm sido conhecidas por serem um fator muito importante em muitos tipos de câncer, incluindo os carcinomas uroteliais (Mitra *et al.*, 2006). A inativação combinatória das proteínas p53 e PTEN (Fosfatase Homóloga a Tensina) são os principais fatores causais que predizem pior prognóstico de CB invasivo (Puzio-Kuter *et al.*, 2009).

PTEN é um gene supressor de tumores e a diminuição da sua expressão foi observada em grande número de carcinomas uroteliais invasivos (Seront *et al.*, 2013; Tsuruta *et al.*, 2006). Tsuruta *et al.* (2006) observaram a redução ou perda da expressão da proteína PTEN em 42% dos CBs papilíferos de baixo grau (pTa) e em 94% dos CBs invasivos (pT2 ou superior).

Evidências sugerem que o controle de PTEN na via Akt desempenha um importante papel na modulação da degradação de p53 dependente de Mdm2 (Freeman *et al.*, 2003; Kohn & Pommier, 2005). A proteína PTEN se liga estruturalmente a p53 no núcleo através de p300/CBP formando um complexo PTEN-p300-p53. A formação desse complexo resulta no aumento da atividade transcricional de p53 (Freeman *et al.*, 2003; Kohn & Pommier, 2005; Oki *et al.*, 2005). O complexo p53-PTEN acentua a atividade transcricional de p53 junto ao DNA e induz a transcrição do gene PTEN, elevando os níveis dessa proteína (Kohn & Pommier, 2005; Oki *et al.*, 2005). Assim, PTEN exerce importante função na regulação da atividade de p53, uma vez que a ausência de PTEN funcional resulta na perda da atividade de p53 e na incapacidade das células neoplásicas em responder a danos em seu DNA através da indução de reparo ou apoptose (Freeman *et al.*, 2003; Kohn & Pommier, 2005; Oki *et al.*, 2005). Ainda, a expressão de PTEN induz a apoptose e suprime o crescimento celular através da ativação da caspase-3 e supressão de NF- κ B (Yan *et al.*, 2006).

PTEN atua como supressor tumoral ao desfosforilar a posição 3 de fosfatidilinosítídeos, tal como ocorre com PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), onde a desfosforilação ocorre na posição 3 de inositol, produzindo PIP2 (fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato) (Steck *et al.*, 1997; Oki *et al.*, 2005; Puzio-Kuter *et al.*, 2009). PIP3, localizado na membrana nuclear, promove a sobrevivência celular por inibir a fosfoproteína nucleolar B23, o que sugere que PTEN, tanto no núcleo como no citoplasma, pode atuar como um regulador crucial para a sobrevivência celular (Ji-Hyun & Charis, 2005). Por meio da desfosforilação de PIP3, PTEN antagoniza as atividades de PI3K e Akt, que podem atuar como oncogenes por promoverem a sobrevivência celular (Kohn & Pommier, 2005). Ao evitar a fosforilação de

Akt, PTEN parece não somente controlar a fosforilação de Mdm2 patrocinada por Akt, como também é capaz de regular negativamente a transcrição de Mdm2 (Bettendorf *et al.*, 2004).

Akt, ou proteína quinase B, é o principal efetor a jusante da serina/treonina quinase regulada por PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (Tsuruta *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Considerando que Akt é normalmente ativado por fatores de crescimento em uma maneira dependente de PI3K, tanto PI3K quanto Akt são frequentemente ativadas e superexpressas em tumores humanos comuns (Xu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Vários mecanismos pelos quais a via PI3K é ativada no carcinoma urotelial foram identificados (Knowles *et al.*, 2009). Akt é ativado em 55% dos CBs primários e a ativação da via PI3K/Akt confere resistência quimioterapêutica em numerosos tipos de tumores incluindo CBs (Shukla *et al.*, 2007; Tsuruta *et al.*, 2006). Osaki *et al.* (2004) relatam que Akt regula indiretamente a proteína supressora de tumores p53, que atua como um sensor ao estresse celular, e transduz sinais de estresse em sinais apoptóticos. Após estimulação por fatores de crescimento Akt fosforila a proteína Mdm2 (murino duplo minuto-2 homólogo) promovendo a sua translocação para o núcleo, onde induz uma diminuição nos níveis de p53 e na sua transativação (Osaki *et al.*, 2004; Vara *et al.*, 2004). Na ausência do supressor tumoral p19/p14^{ARF}, o complexo Mdm2-p53 sai do núcleo e entra no citoplasma, onde p53 é degradado através de um processo mediado por ubiquitina-proteassoma (Vara *et al.*, 2004). Ao promover a degradação de p53, Akt prejudica a resposta ao estresse celular, aumentando a atividade de sobrevivência das células tumorais (Osaki *et al.*, 2004).

Outro fator importante na progressão do CBNMI é a angiogênese, caracterizada pelo aumento da densidade vascular, também pode ser considerado um marcador tumoral prognóstico independente, pois a alta densidade vascular está associada a um mau prognóstico do CB (Crew *et al.*, 1997; Crew *et al.*, 1999).

A angiogênese é uma condição prévia, necessária para o crescimento tumoral e metástases e é induzida por fatores angiogênicos produzidos pelo tumor ou pelas células não malignas que infiltram o tumor (O'Brien *et al.*, 1995; Plate *et al.*, 1992). Numerosos fatores angiogênicos têm sido descritos, sendo que VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) desempenha um papel fundamental neste processo (Crew *et al.*, 1997; Crew *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 1995). VEGF promove a angiogênese, estimulando todos os aspectos da função endotelial como a proliferação capilar, migração, produção de óxido nítrico e permeabilidade da camada de células endoteliais (O'Brien *et al.*, 1995; Waltenberger, 2009). Além disso, a ação do VEGF protege o endotélio da apoptose (Waltenberger, 2009). Esse fator de crescimento tem sido proposto como um novo fator de

risco para o CB, pois níveis elevados são expressos por diversos tumores sugerindo que VEGF pode fornecer informações prognósticas nesses tumores (Crew *et al.*, 1999; Henríquez-Hernández *et al.*, 2012). Pesquisas realizadas por Henríquez-Hernández *et al.* (2012) indicaram que variações em regiões reguladoras do VEGF poderiam modificar o risco de desenvolver CB. Estudos demonstram que VEGF é um dos principais determinantes do comportamento biológico no início do CB, indicando a possibilidade de tratamento por meio de estratégias anti-VEGFs (Crew *et al.*, 1997).

Nessa linha de pesquisa, a angiogênese tem sido estudada durante muitos anos e os resultados indicam que a terapia antiangiogênica oferece novas oportunidades que permitem o tratamento do câncer e outras doenças dependentes de angiogênese (Folkman, 2006). Recentemente, vários inibidores da angiogênese têm sido objeto de testes clínicos (Schuch *et al.*, 2003). A endostatina é um potente inibidor direto endógeno da angiogênese, a qual induz apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'Reilly *et al.* 1997; Schmidt *et al.*, 2004). É, portanto, uma potente substância antitumoral, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos (O'Reilly *et al.*, 1997). A maior contribuição da endostatina seria introduzir uma mudança no pensamento convencional a partir do desenvolvimento de inibidores da angiogênese com múltiplos alvos de regulação da vascularização e do suprimento sanguíneo, mas pouca ou nenhuma toxicidade (Folkman, 2006).

Du & Hou (2003) descobriram que a endostatina pode inibir significativamente o crescimento dos tumores da bexiga em ratinhos. Quando avaliaram o tecido tumoral no grupo tratado com endostatina, observou-se que a expressão de VEGF foi significativamente regulada negativamente, enquanto que a apoptose foi regulada positivamente. Por isso, acredita-se que alguns mecanismos de ação da endostatina incluem indução de apoptose, diminuindo a angiogênese e alterando a relação entre a MMP-2 e TIMP-2, diminuindo assim, o crescimento do tumor, invasão e metástase. Esses dados indicam que a endostatina retarda de forma potente o crescimento do tumor de bexiga, diminui os níveis proteicos de VEGF e induz a apoptose das células tumorais.

1.3. Imunoterapia intravesical com Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

De acordo com Pashos *et al.* (2002) a terapia intravesical envolve a administração da medicação (isto é, uma imunoterapia ou agente quimioterápico) dentro do lúmen da bexiga. Os objetivos da terapia intravesical são: prevenir e retardar a recorrência do tumor; erradicar células tumorais papilares não ressecáveis ou carcinoma *in situ*; prevenir a progressividade do

tumor; reduzir a necessidade de cistectomia radical; manter e prolongar a boa qualidade de vida relacionada à saúde (Pashos *et al.*, 2002).

Para os tratamentos através da via intravenosa, geralmente são necessárias administrações de doses mais altas dos fármacos, já que esses não são específicos, apenas uma parte é distribuída pelo organismo, além dos mesmos sofrerem metabolização e excreção antes de ter sua ação no local específico e por esse motivo os efeitos adversos são mais pronunciados (Capaz *et al.*, 1988).

Nessa linha, a via intravesical para a administração de fármacos no trato urinário tem sido muito utilizada, já que a bexiga é um órgão de fácil acesso (Adiyat *et al.*, 2010). Portanto, a administração intravesical de fármacos é adequada para terapia tópica, pois através dessa via é possível expor a área lesionada (bexiga/tumores) diretamente ao fármaco e a quantidade de fármaco administrado pode ser facilmente controlada (Adiyat *et al.*, 2010). Dessa forma, o ideal é a administração do fármaco no local onde sua ação é desejada, pois essa estratégia pode aumentar a eficácia farmacológica e diminuir a dose do fármaco necessária para a obtenção do efeito desejado, diminuindo assim os efeitos tóxicos (Capaz *et al.*, 1988). As vantagens da instilação intravesical de fármacos incluem a redução de efeitos colaterais sistêmicos que os fármacos utilizados no tratamento de doenças causam quando administrados por via intravenosa, assim como o aumento da dose do fármaco no tecido da bexiga (Martin *et al.*, 2013).

O câncer vesical é caracterizado por lesões superficiais (CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (Askeland *et al.*, 2012). Por outro lado, sabe-se que a terapia adjuvante com BCG diminui esses índices de progressão e recorrência da doença (Hall *et al.*, 2007; Askeland *et al.*, 2012).

Morales *et al.* (1976) foram pioneiros a comprovar o sucesso do tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas & Brandau, 2003; Hall *et al.*, 2007; Askeland *et al.*, 2012). Donin *et al.* (2017) evidenciam que o uso de BCG no tratamento do carcinoma urotelial continua sendo uma das terapias mais bem-sucedidas na história da imunoterapia do câncer e atualmente representa uma das áreas mais ativas da pesquisa urológica em andamento.

Schamhart *et al.* (2000) sugerem que após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e histiócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de um ano. Ainda de acordo

com Schamhart *et al.* (2000) tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação.

Redelman-Sidi *et al.* (2014) sugerem que na imunoterapia com BCG ocorra um possível envolvimento das células do CB na adesão e internalização da BCG, a secreção de citocinas e quimiocinas, e apresentação da BCG e/ou antígenos das células tumorais às células do sistema imune. A Figura 4 representa a complexa resposta imunitária local que envolve mecanismos efetores da imunidade celular e humoral que é induzida por BCG na bexiga humana (Böhle, 2000). Após a internalização, as células tumorais da bexiga regulam a expressão de MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) classe I e II (Redelman-Sidi *et al.*, 2014). Subconjuntos de células do sistema imune que possuem papéis potenciais na terapia com BCG incluem os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células NK (Exterminadoras Naturais), histiócitos, macrófagos e células dendríticas (Andreas & Brandau, 2003; Böhle, 2000; Redelman-Sidi *et al.*, 2014). Ocorre então, uma resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical (Redelman-Sidi *et al.*, 2014). A função dessa inflamação prolongada parece proporcionar células efetoras imaturas com um nível de ativação contínuo de citocinas (tais como IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF) (Böhle, 2000; Redelman-Sidi *et al.*, 2014). Essas citocinas juntamente com as células dendríticas induzem resposta de linfócitos T auxiliares e das células NK na bexiga resultando em citotoxicidade sobre as células tumorais da bexiga através de vários mecanismos imunológicos (Andreas & Brandau, 2003; Redelman-Sidi *et al.*, 2014).

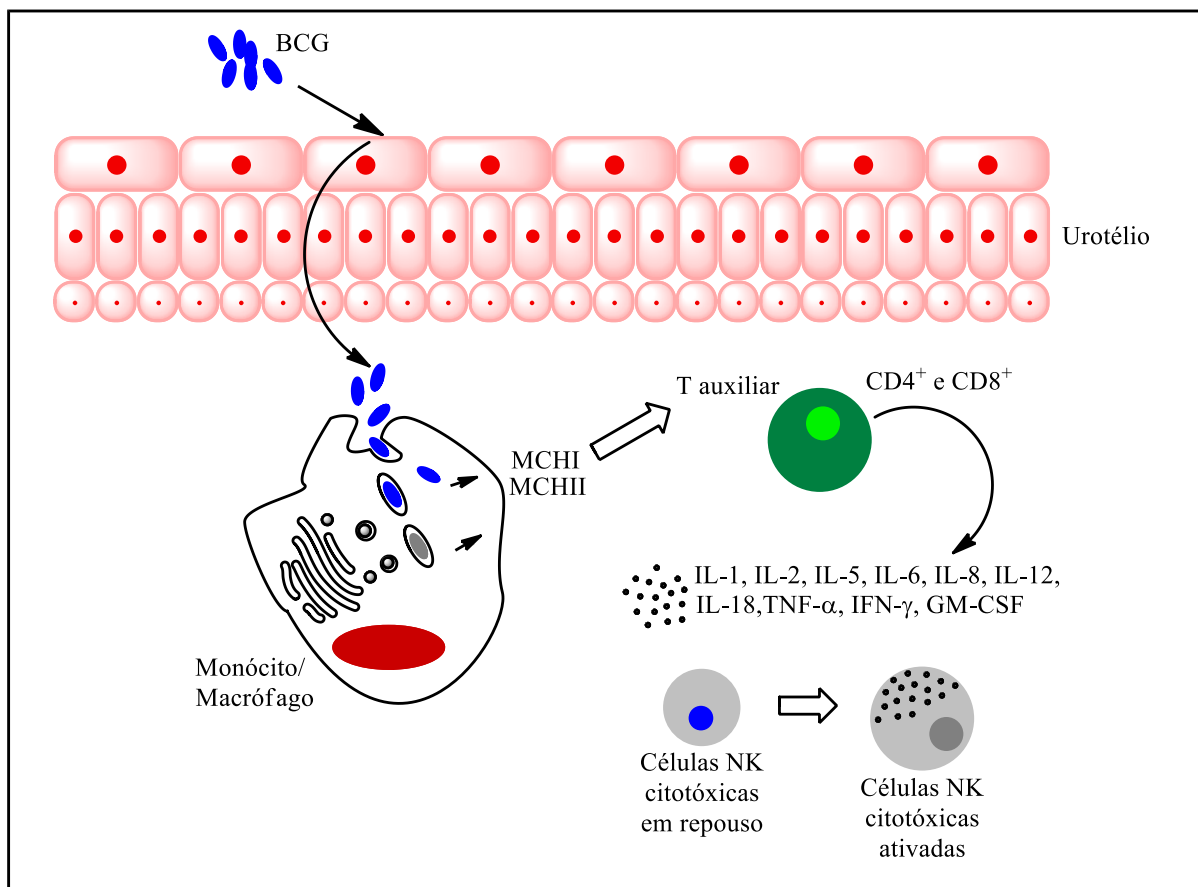


Figura 4: Hipótese do mecanismo da ação da BCG no câncer de bexiga: ajudada por células T auxiliares ($CD4^+$), micobactérias BCG induzem uma secreção de citocinas Th1 polarizadas em macrófagos / monócitos. Essas citocinas ativam células NK em repouso, que matam as células tumorais de modo dependente da perforina. Modificado de: Böhle (2000) e Redelman-Sidi *et al.* (2014).

Entretanto, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldades em prever respostas, além de BCG continuar sendo apenas parcialmente eficaz (Lamm *et al.*, 1986). Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização, pneumonia, sepsia e hepatite (Böhle & Brandau, 2003; Lamm *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 2007; Sylvester *et al.*, 2002). Além disso, a resposta a BCG é imprevisível em quase 40% dos pacientes que desenvolvem a progressão da doença invasiva apesar do tratamento com BCG (Martin *et al.*, 2013).

Ainda existem várias lacunas nos conhecimentos relacionados à imunoterapia com BCG para o tratamento do CB, que devem ser abordadas em estudos futuros para melhor compreensão dessa bioterapia (Redelman-Sidi *et al.*, 2014). Porém, perto da quinta década de uso da BCG para o tratamento de CB a compreensão do seu mecanismo de ação está se tornando mais clara (Pashos *et al.*, 2002; Redelman-Sidi *et al.*, 2014). Espera-se que através

de pesquisas esse entendimento possa ser traduzido para a prática clínica, levando ao desenvolvimento de ferramentas para prever melhor a resposta do paciente à BCG, e à descoberta de formas de tratamento mais eficazes e menos tóxicas para o CB em estádios iniciais (Redelman-Sidi *et al.*, 2014).

1.4. Atividade antitumoral de complexos metálicos

Ao longo da história muitos compostos contendo metais foram utilizados no tratamento de uma grande variedade de doenças (Frezza *et al.*, 2010). Na química medicinal, que tradicionalmente era dominada pela química orgânica, os complexos metálicos ofereceram novas possibilidades como ferramentas de diagnósticos e agentes antitumorais (Bruijninx & Sadler, 2008; Frezza *et al.*, 2010). O interesse em fármacos antitumorais à base de metais aumentou desde a descoberta da atividade biológica da cisplatina [*cis*-diamino-dicloro-platina (II)] para o tratamento de tumores sólidos (Zhang *et al.*, 2012a). A cisplatina possui um largo espectro de atividade antitumoral, é largamente utilizada no tratamento de vários tumores malignos e depois que o CB progride para a doença metastática a única opção de tratamento é baseada em uma quimioterapia combinada com cisplatina (Zhang *et al.*, 2012b).

Esses fármacos são, basicamente, complexos metálicos que possuem a capacidade de se ligarem as nucleobases do DNA e clivar essa molécula hidroliticamente ou oxidativamente (Chakraborty *et al.*, 2010). A ligação da cisplatina ao DNA provoca uma distorção importante da estrutura helicoidal e resulta na inibição da replicação e da transcrição do DNA (Figura 5) (Zhang & Lippard, 2003). A célula afetada, em seguida, sofre apoptose se o dano ao DNA for irreparável ou os fatores de transcrição do ciclo celular forem bloqueados (Fuertes *et al.*, 2003). A cisplatina forma um aduto platina-DNA na posição N7 da guanina, originando ligações cruzadas intracadeias e também ligações intercadeias, a ligação cruzada intracadeia 1,2-d(GpG) é o principal aduto (Chakraborty *et al.*, 2010; Zhang & Lippard, 2003). Assim, ativa proteínas em resposta ao dano que inibem a quinase dependente de ciclina (CDK) e finalmente as células sofrem apoptose via p53 (Chakraborty *et al.*, 2010).

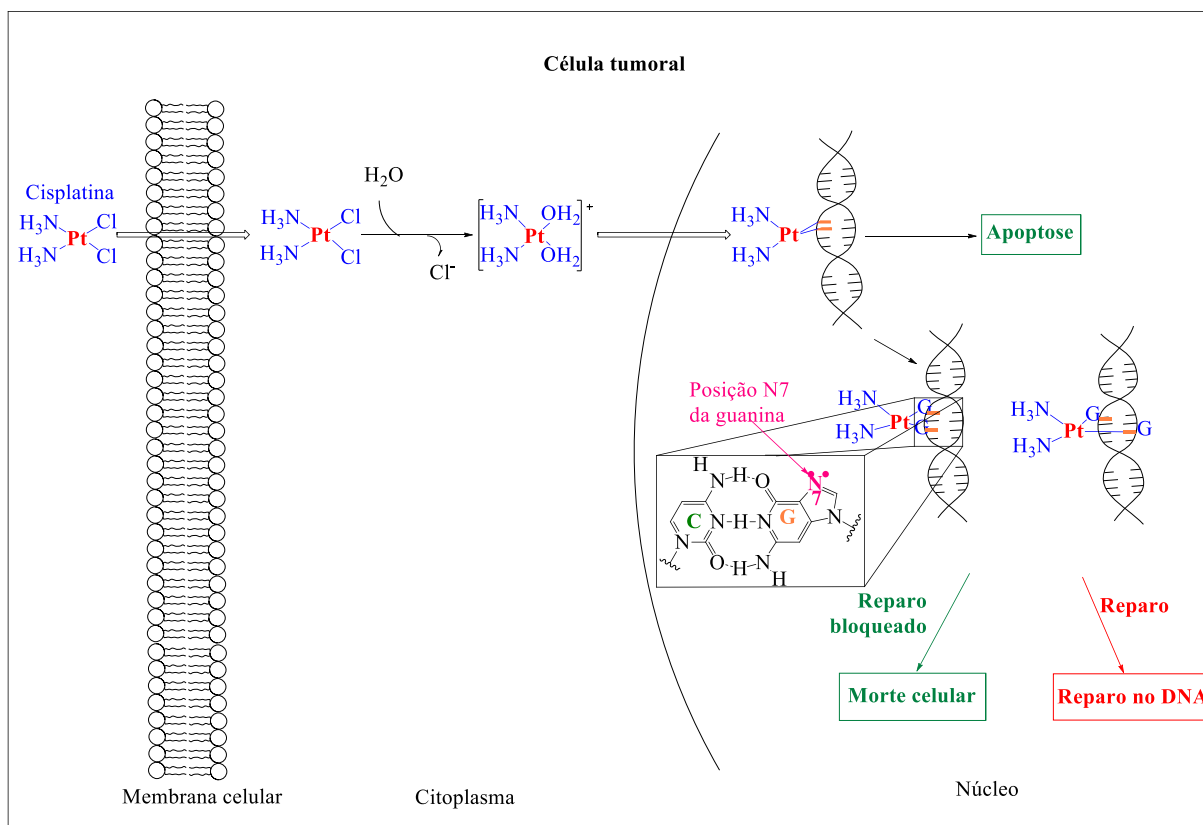


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação da cisplatina. Modificado de: Wang & Lippard (2005); Alderden *et al.* (2006).

Apesar do sucesso da cisplatina, existem sérias preocupações com seu uso devido a sua toxicidade, resistência intrínseca ou adquirida, estreito espectro de ação para certos fenótipos de câncer e adesão do paciente ao tratamento, o que limita gravemente o potencial terapêutico desse fármaco (Tabassum *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012b). Além disso, apenas uma pequena fração da platina (Pt) total administrada acumula-se no local do tumor, resultando numa concentração do fármaco subótima nas células cancerígenas que se dividem rapidamente (Patra *et al.*, 2016; Ruiz *et al.*, 2011). A maior parte do fármaco se liga a outros nucleófilos biológicos resultando em efeitos tóxicos (Ruiz *et al.*, 2011).

Isso justificou a necessidade de modificação do ligante da cisplatina e a procura de outros complexos metálicos biocompatíveis ou benignos que pudessem interagir com o DNA sob condições fisiológicas (Chakraborty *et al.*, 2010). Recentemente novas estratégias têm sido desenvolvidas para tentar diminuir esses efeitos secundários ou para aumentar o espectro de atividade através de sistemas de carreamento de fármacos aos alvos desejados que sejam mais eficazes (Ruiz *et al.*, 2011). Após vários anos de esforços, a busca por novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer tem se tornando uma área crescente, despertando expectativas de desenvolver terapias mais específicas e que substituam a quimioterapia tradicional, que é bem conhecida por seus efeitos colaterais graves e toxicidade (Dogan *et al.*,

2014; Filomeni *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2011). Muitos de compostos de Pt já foram sintetizados e avaliados como potenciais agentes quimioterapêuticos, e alguns foram introduzidos em uso clínico como a carboplatina e a oxaliplatina (Alderden *et al.*, 2006; Ronconi & Sadler, 2007).

O fármaco de segunda geração a base de Pt, a carboplatina, $[\text{Pt}(\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4)(\text{NH}_3)_2]$, reduziu efeitos colaterais tóxicos para a mesma eficiência graças à sua reatividade muito menor e possui a vantagem de ser mais facilmente utilizada em terapia de combinação (Abu-Surrah & Kettunen, 2006; Reedijk, 2003). Infelizmente, a carboplatina só é ativa na mesma gama de tumores que a cisplatina e ainda é administrada por via intravenosa (Abu-Surrah & Kettunen, 2006). No Japão, outro derivado de segunda geração, a nedaplatina, é recomendado para uma variedade de tratamentos contra o câncer, incluindo câncer testicular, ovariano e cervical (Reedijk, 2003).

O principal fator para explicar o motivo da Pt ser mais utilizada claramente refere-se a cinética de troca de ligantes, pois os complexos de Pt sofrem reações de troca de ligantes sob condições fisiológicas muito lentas ou não ocorrem em único passo, evitando assim reações de equilíbrio rápidas (Reedijk, 2003; Rijt & Sadler, 2009). Uma propriedade importante dos compostos de coordenação de Pt é o fato de que a ligação Pt-ligante, que tem a força termodinâmica de uma ligação de coordenação típica, é muito mais fraca do que ligações simples e duplas (covalentes) C-C e C-N ou C-O (Kostova, 2006). No entanto, o comportamento de troca de ligantes dos compostos de Pt é bastante lento, o que lhes confere uma estabilidade cinética elevada e resulta em reações de troca de ligantes que podem levar de minutos a dias, em vez de microssegundos a segundos como muitos outros compostos de coordenação (Reedijk, 2003). Além disso, a Pt (II) tem uma forte afinidade termodinâmica em coordenar-se à ligantes S-doadores (Kostova, 2006). Por essa razão, seria possível prever que os compostos de Pt possivelmente atingiriam o DNA, com muitos platinófilos celulares (ligantes S-doadores, como a glutatona e a metionina) como ligantes competindo no citosol (Dirersa, 2014). Finalmente, deve ser mencionado o chamado efeito *trans* cinético, que é responsável pelas reações de troca de ligantes sobre metais, onde ligantes nas posições *trans* para labilizar outros ligantes com um forte efeito *trans* (tais como muitos ligantes leves) são mais rapidamente substituídos do que ligantes nas posições *cis* (Kostova, 2006).

Embora existam numerosos complexos de Pt com atividade antiproliferativa, a maioria deles não é utilizada em estudos clínicos devido à sua toxicidade, pois causam numerosos efeitos secundários indesejáveis (Chaviara *et al.*, 2005). Assim, estudos relativos aos elementos metálicos essenciais têm recebido muita atenção em contraste com a Pt, uma vez

que os medicamentos desenvolvidos e sintetizados a partir de íons metálicos endógenos podem ser menos prejudiciais e mais propensos a atividade antiproliferativa contra tumores (Tabassum *et al.*, 2012).

Com o objetivo de descobrir diferentes complexos metálicos que apresentem menos efeitos secundários e citotoxicidade similar ou melhor, complexos metálicos contendo outros íons metálicos como agentes quelantes têm recebido considerável atenção como potenciais agentes antitumorais (Frezza *et al.*, 2010; Jevtovic, 2014). A escolha dos ligantes coordenados parece ser tão importante quanto a escolha de metais, pois além de serem parte integrante de complexos biologicamente ativos, essas moléculas orgânicas (ligantes) podem exercer uma atividade biológica própria (Jevtovic, 2014). Como resultado, um novo grupo de complexos com diferentes aminas e sem a estrutura *cis*-diamina clássica com dois grupos de saída tem evoluído ultimamente (Reedijk, 2003). Esses complexos são frequentemente considerados como as drogas de terceira geração e incluem compostos que contêm diferentes tipos de aminas quirais como a oxaliplatina ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$) (Abu-Surrah & Kettunen, 2006; Reedijk, 2003).

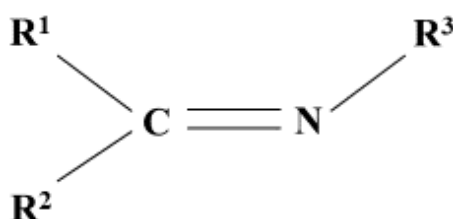
Dessa maneira, novas e alternativas formas de quimioterapia poderiam ser consideradas como uma solução para o tratamento do câncer, resultando na eliminação das células malignas e não apresentarem toxicidade específica sobre os outros tipos de células saudáveis (Dogan *et al.*, 2014). Explorar e sintetizar novas moléculas capazes de interagir com os ácidos nucleicos, fragmentar o DNA das células tumorais e desencadear a apoptose é atualmente uma das estratégias mais promissoras para a descoberta de novos medicamentos antineoplásicos que possam ser utilizados na quimioterapia (Qiao *et al.*, 2011). Assim, investigações sobre a interação entre complexos metálicos e o DNA têm atraído grande interesse devido a sua importância na terapia do câncer e biologia molecular (Yang *et al.*, 2010).

1.4.1. Complexos metálicos derivados de bases de Schiff

Um dos objetivos principais da pesquisa farmacológica é a busca por novas estruturas moleculares que apresentem atividades antitumorais eficazes (Baul *et al.*, 2009). Esforços enormes são dirigidos para o desenvolvimento de novos compostos químicos capazes de pararem ou reverterem o desenvolvimento do câncer (Chang *et al.*, 2016). Isso levou os químicos inorgânicos e organometálicos a sintetizarem novos compostos metálicos que apresentem boas atividades, especialmente contra tumores responsáveis por alta mortalidade (Baul *et al.*, 2009).

Nesse contexto, as atividades biológicas de complexos de metais de transição derivados de bases de Schiff (BSs) são uns dos tópicos mais estudados em química de coordenação, devido às suas maiores atividades em comparação com os complexos que não são derivados de BSs (Chang *et al.*, 2016). As BSs são conhecidas por sua forte capacidade de coordenação, funcionando como ligantes, sendo capazes de formarem complexos altamente estáveis com íons metálicos, o que os tornam fontes atrativas para aplicações biológicas (Dogan *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

As BSs foram identificadas e caracterizadas pela primeira vez por Hugo Schiff em 1864 e são resultado da reação de condensação de aminas primárias com aldeídos (Dogan *et al.*, 2016). As BSs pertencem a uma enorme classe de compostos orgânicos que possuem em sua estrutura molecular um grupo funcional imina, ou seja, uma dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio (-CH=N-) (Yang *et al.*, 2016). As BSs possuem fórmula geral $R^1R^2C = NR^3$ (Figura 6), onde R^1 é um grupo aril, R^2 é um átomo de hidrogênio e R^3 é um grupo alquil ou aril que faz da BS uma imina estável (Silva *et al.*, 2011).



R^1, R^2 e/ou $R^3 =$ alquil ou aril

Figura 6: Estrutura geral das bases de Schiff. Fonte: Silva *et al.*, 2011.

Uma vez que as BSs são capazes de formarem complexos estáveis com a maioria dos metais de transição, esses complexos têm sido amplamente explorados devido à sua flexibilidade, seletividade e sensibilidade em relação ao átomo metálico central, semelhanças estruturais com substâncias biológicas naturais e a presença do grupo imina que confere atividade biológica (El-Sherif & Eldebss, 2011; Rama & Selvameena, 2015). Os complexos derivados de BSs apresentam importantes atividades fisiológicas e farmacológicas devido à sua permeabilidade à membrana celular favorável (Chang *et al.*, 2016).

Complexos metálicos constituídos de BSs pertencem a uma importante classe de compostos na química medicinal que apresentam expressiva atividade antineoplásica devido às propriedades do seu centro metálico ou dos ligantes coordenados ao metal, bem como as propriedades estruturais e eletrônicas que são atribuídas à coordenação (Hajrezaie *et al.*, 2014; Helal *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2011).

De acordo El-Sherif & Eldebss (2011) os compostos orgânicos exibem atividade biológica aumentada quando administrados na forma de complexos metálicos em vez de somente compostos orgânicos livres. A coordenação do composto orgânico ao metal, isto é, a complexação acarreta uma mudança drástica na propriedade biológica tanto do ligante quanto do metal, pois complexos metálicos desempenham um papel essencial na química da matéria viva (Joseph *et al.*, 2013). Khan *et al.* (2015) relatam que a presença de um íon metálico aumenta a atividade dos complexos em geral e ajuda a diminuir os efeitos secundários dos compostos orgânicos precursores.

Embora existam diferentes hipóteses para explicarem suas atividades antitumorais, os exatos mecanismos moleculares de ação desses complexos ainda não são conhecidos e o efeito antitumoral pode variar dependendo do tipo de câncer e do próprio complexo (Helal *et al.*, 2010). Evidências sugerem que esses complexos se ligam aos átomos de nitrogênio dos componentes do DNA causando danos às células cancerosas e assim conferem o efeito antitumoral (Dogan *et al.*, 2014). Demirci *et al.* (2015) relatam que a reatividade desses compostos aos grupos nucleofílicos em proteínas e locais ricos em Guanina e Citosina no DNA resultem em danos a proteínas e ao DNA, o que confere a atividade antitumoral. Chaviara *et al.* (2005) citam que as diferenças observadas na atividade antitumoral parece depender também, em parte, da natureza do contra-íon (Cl, Br, ou NO₃) uma vez que esses podem ser considerados como grupos de saída, preferencialmente, permitindo a coordenação do DNA ou da proteína ao metal.

Assim, a síntese de novos agentes derivados de BSs que apresentem atividades biológicas tem despertado interesse no campo da ciência farmacológica (Demirci *et al.*, 2015). Porém, um dos principais problemas que dificulta o desenvolvimento de complexos derivados de BSs para aplicação medicinal é a sua fraca estabilidade em soluções aquosas (Enyedy *et al.*, 2011; Lloret *et al.*, 1991). Uma vez que a integridade original dos complexos pode ser alterada na fase aquosa, é importante investigar a lipofilicidade desses complexos com atenção voltada para a especiação química e o estudo dos ligantes carreadores livres (Enyedy *et al.*, 2011).

Enyedy *et al.* (2011) definem a lipofilicidade como uma propriedade físico-química fundamental para caracterizar um fármaco, uma vez que exerce um efeito fundamental sobre o perfil farmacocinético. O caráter lipofílico de um composto pode influenciar os processos de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e também a capacidade de ligação à proteína ou ao receptor, a eficácia de inibição da enzima, etc., afetando também a atividade, a toxicidade, a bioacumulação ou a via de administração (Enyedy *et al.*, 2011; Rutkowska *et al.*,

2013). O conhecimento da lipofilicidade de um potencial medicamento pode contribuir fortemente para o sucesso dos estudos da relação estrutura-atividade quantitativa (Enyedy *et al.*, 2011). Foteeva *et al.* (2011) ressaltam a importância do desenvolvimento de compostos lipofílicos com elevada e rápida capacidade de permear biomembranas e de se ligarem ao alvo, induzindo assim a resposta desejada. Esse problema parece ser especialmente importante no caso de agentes antitumorais a base de metais cuja descoberta e desenvolvimento clínico permanecem bastante ineficientes (Foteeva *et al.*, 2011). Além disso, durante a instilação intravesical de fármacos os desafios incluem baixa permeabilidade do urotélio da bexiga e o curto período de tempo de exposição do fármaco devido à sua diluição durante o enchimento ou eliminação durante o esvaziamento da bexiga (Martin *et al.*, 2013).

1.5. Nanopartículas lipídicas na terapia intravesical

Nanopartículas têm sido desenvolvidas e aplicadas como carreadores farmacêuticos em terapias contra o câncer, devido às suas versáteis capacidades como o transporte e a proteção do fármaco da degradação, promovendo a interação entre os fármacos e as células alvo, ou aumentando a permeabilidade dos mesmos e essas vantagens podem suprir as deficiências do carreamento intravesical convencional de fármacos (Hsu & King, 2012). Vários tipos de nanopartículas têm sido desenvolvidas como carreadoras de fármacos para a terapia intravesical e os resultados obtidos foram positivos em estudos pré-clínicos, indicando que a utilização de nanopartículas no tratamento de câncer urotelial da bexiga urinária pode reduzir os efeitos secundários negativos e as taxas de recorrência (Chen *et al.*, 2015; Hsu & King, 2012).

Hidrogéis poliméricos, nanopartículas, microesferas e sistemas de administração de fármacos à base de lipídios, tais como emulsões lipídicas, lipossomas e nanopartículas lipídicas são exemplos de sistemas de carreadores particulados (Almeida & Souto, 2007).

Embora algumas tentativas têm sido realizadas para carrear agentes antitumorais que utilizam nanopartículas e lipossomas pela via intravesical, as principais limitações desses sistemas são a instabilidade durante a instilação, a biodegradabilidade, o vazamento do fármaco e os efeitos colaterais adversos associados ao fármaco (Almeida & Souto, 2007).

Nanopartículas lipídicas são sistemas carreadores inovadores desenvolvidos como uma alternativa aos carreadores tradicionais, tais como nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (Puglia & Bonina, 2012). Dois sistemas de nanopartículas lipídicas têm sido utilizados na terapia do câncer: as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e os carreadores

lipídicos nanoestruturados (CLNs), ambos compostos por lipídios (Chen *et al.*, 2015; Hsu & King, 2012).

NLSs têm recebido especial atenção como um carreador de fármaco coloidal lipofílico alternativo, eficaz e não tóxico preparado com lipídios fisiológicos ou moléculas lipídicas utilizados como excipientes farmacêuticos comuns (Almeida & Souto, 2007). As NLSs apresentam diversas vantagens, como boa tolerabilidade e biodegradabilidade, uma maior estabilidade em comparação com nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões (Patlolla *et al.*, 2010).

As NLSs são preparadas a partir de um único lipídio purificado e forma uma estrutura cristalina que permite a incorporação de pequenos fármacos moleculares (Müller *et al.*, 2002). As NLSs combinam as vantagens de outros sistemas carreadores inovadores, como por exemplo: estabilidade física, proteção de fármacos lábeis incorporados da degradação, liberação controlada e excelente tolerabilidade, que minimizam os problemas associados a esses nanocarreadores (instabilidade física, toxicidade dos componentes, dificuldade de escalonamento) (Wissing *et al.*, 2004). Porém, existem alguns problemas associados a esse novo sistema como a baixa capacidade de carga, a elevada expulsão do fármaco durante o armazenamento devido a transições polimórficas dos lipídios e o alto teor de água das dispersões aquosas de NLSs (70-95%) (Müller *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2004).

Isso, conseqüentemente, levou a uma nova e melhorada geração de nanopartículas lipídicas, os CLNs (Figura 7) (Müller *et al.*, 2002). Em contraste com as NLSs que são produzidas a partir de lipídios sólidos, os CLNs são produzidos pela mistura controlada de lipídios sólidos com os lipídios líquidos espacialmente incompatíveis, o que leva a mais imperfeições na matriz lipídica, aumentando os espaços para acomodar o fármaco, acarretando em maior eficiência de encapsulação e, além disso, os componentes ativos podem ser dissolvidos nos nanocompartimentos de óleo localizados no interior da matriz sólida (Wissing *et al.*, 2004).



Figura 7: Desenho esquemático do CLN. Fonte: Müller *et al* (2000).

Os CLNs são sólidos e amorfos, o que evitaria ou diminuiria a expulsão do fármaco durante o período de armazenagem, pois isso ocorre devido a modificações nas formas polimórficas dos cristais lipídicos das NLSs (Chen *et al.*, 2015; Pardeike *et al.*, 2009; Souto *et al.*, 2004). Na Figura 8 está representada a diferenciação entre NLSs e CLNs durante o período de armazenamento.

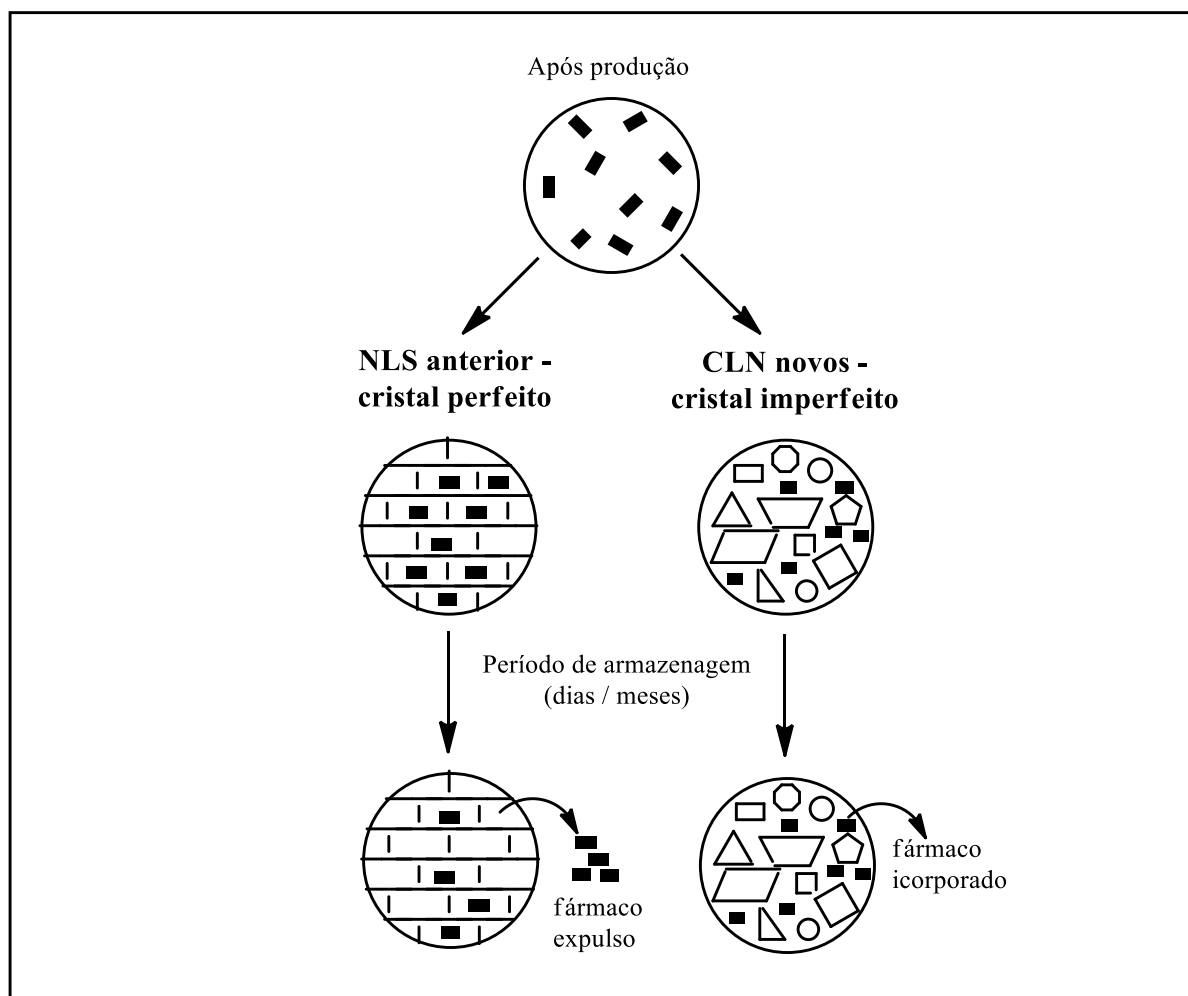


Figura 8: Representação esquemática da organização e acomodação do fármaco nas NLSs (esquerda) que formam matrizes lipídicas semelhantes a uma parede de tijolos (compacta e organizada) e nos CLNs (direita) que possuem uma matriz lipídica mais imperfeita (evitando/diminuindo a expulsão do fármaco durante o período de estocagem). Adaptado de: Müller *et al.* (2002); Souto *et al.* (2004).

Ao longo dos últimos anos, CLNs têm atraído considerável interesse como veículos alternativos para produtos farmacêuticos anticancerígenos (Chen *et al.*, 2015). A incorporação dos agentes citotóxicos em carreadores nanoestruturados é uma estratégia promissora para aumentar a eficácia e segurança do tratamento medicamentoso (Wong *et al.*, 2007). Os nanocarreadores podem ser passivamente direcionados para a massa tumoral sólida com redução dos efeitos tóxicos do fármaco sobre os tecidos normais (Brigger *et al.*, 2002). O uso dos nanocarreadores no tratamento do câncer pode ainda resultar na diminuição da biotransformação do fármaco, no aumento de sua estabilidade química e no controle de sua biodisponibilidade (Feng & Chien, 2003; Müller *et al.*, 2000).

Essas partículas podem encapsular inúmeros fármacos (tanto lipofílicos quanto hidrofílicos) e podem ser administradas por diferentes vias, inclusive a intravesical, pois a alta viscosidade do CLN o protege da descarga de urina (GuhaSarkar & Banerjee, 2010; Hsu &

King, 2012; Mehnert & Mäder, 2012; Üner & Yener, 2007). Evidências indicam que aplicações da nanotecnologia na terapia intravesical pode aumentar a retenção do fármaco na bexiga e a permeabilidade do fármaco nas lesões de bexiga (Hsu & King, 2012). Além disso, Hsu & King (2012) ainda relatam que as nanopartículas podem carrear algumas moléculas que não podem ativamente ser transportadas nas lesões da bexiga. Vários tipos de nanopartículas têm sido bem relacionados com as terapias de doenças da bexiga, incluindo CB superficial (Hsu & King, 2012). Dessa forma, espera-se que a encapsulação de compostos lipofílicos em nanopartículas melhore a estabilidade, protegendo o princípio ativo da degradação e liberem o fármaco encapsulado de uma forma controlada durante um período de tempo prolongado (Patlolla *et al.*, 2010).

O uso de nanocarreadores também pode dificultar o reconhecimento do fármaco pela P-gp (glicoproteína-P), diretamente ligada ao aparecimento do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (Vauthier *et al.*, 2003). P-gp é considerada uma proteína de membrana muito importante que expulsa o fármaco da célula por uma via dependente de ATP, conforme ilustrado na Figura 9 (Matsson *et al.*, 2009). Essa proteína apresenta elevada inespecificidade a muitos antineoplásicos e muitas células tumorais apresentam superexpressão de P-gp (Brigger *et al.*, 2002; Schellens *et al.*, 2000).

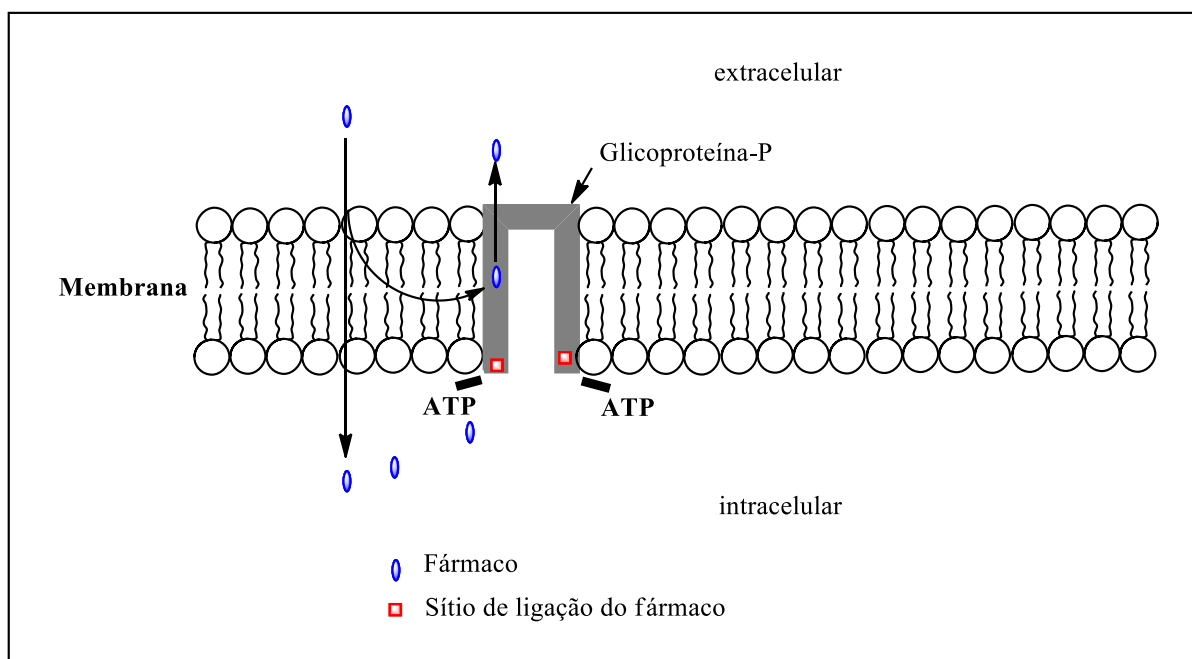


Figura 9: Representação esquemática do mecanismo de ação da glicoproteína-P, no qual o fármaco ao entrar na célula é bombeado para o meio extracelular por um mecanismo ATP-dependente. Modificado de: Krishna & Mayer (2000).

De acordo com Brigger *et al.* (2002) o uso de nanocarreadores consiste em uma estratégia para eliminar os efeitos da P-gp e obter uma terapia alvo específica no tratamento do câncer. Esses mesmos autores também relatam que o antineoplásico localizado dentro de uma nanopartícula pode entrar na célula sem ser reconhecido pela P-gp, aumentando assim sua ação citotóxica.

2. JUSTIFICATIVA

Diariamente a população está exposta a vários agentes carcinogênicos. Entre eles, destacam-se os produtos químicos nos cigarros, a benzidina ou aminas aromáticas no local de trabalho e também compostos *N*-nitrosos e aminas heterocíclicas presentes nas carnes salgadas e grelhadas. Esses compostos podem atuar como iniciadores e promotores de neoplasias podendo causar persistente metilação do DNA. Além disso, os compostos *N*-nitrosos são os únicos carcinógenos conhecidos por agirem diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica e induzem carcinomas uroteliais como o CB. Devido ao elevado custo médico no processo que envolve seu diagnóstico, tratamento e seguimento, o CB é um dos tipos de tumores mais caros para os sistemas de saúde e esse tipo de câncer mata em média 3 mil brasileiros anualmente.

Nos últimos 50 anos, poucos avanços foram alcançados para o tratamento de tumores em um dos principais órgãos do sistema urinário. Atualmente, a imunoterapia com BCG ainda é a forma mais eficaz de terapia intravesical para a profilaxia da recorrência e progressão do CB em estágio inicial. Porém, a imunoterapia com BCG frequentemente causa efeitos adversos locais e sistêmicos, incluindo sepse, além de recorrência tumoral em até 30% dos casos. A terapia intravesical pode ser também empregada utilizando-se quimioterápicos como a mitomicina C. No entanto, a resposta à quimioterapia intravesical é incompleta e a recorrência tumoral é elevada (superior a 80%) em pacientes com doença não-músculo invasiva. Outros pontos relevantes que limitam a utilização das terapias intravesicais com BCG e mitomicina C são a falta da Onco BCG para tratamento de CB e a descontinuação da comercialização da mitomicina C no Brasil.

Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do CB, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas são muito relevantes. Nessa linha, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas ou o melhoramento de fármacos já existentes para o tratamento de CBs como o CBNMI. Assim, a presente proposta visa realizar um estudo sistemático envolvendo o desenvolvimento de complexos metálicos derivados de BS, incorporar o complexo de Pt sintetizado em um CLN e testar a aplicabilidade desses compostos no tratamento do CBNMI.

Um fator relevante para o aumento da eficácia do tratamento de CBNMI, é o estudo dos mecanismos de reparo tecidual, EROs e angiogênese. O planejamento adequado e o emprego das diferentes estratégias terapêuticas no CBNMI que dependem de diversos fatores, os quais incluem o entendimento dos processos de reparo celular e angiogênese, a identificação dos compostos que possam atuar como bloqueadores de EROs, bem como a sua

distribuição no urotélio, e seu mecanismo de ação. Assim, o conhecimento da interação das diferentes modalidades terapêuticas envolvendo complexos metálicos constituídos de BSs com os mecanismos de angiogênese e reparo celular, bem como com as proteínas envolvidas na organização estrutural e molecular do urotélio (uroplaquinas) são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial. Além disso, a combinação desses marcadores moleculares pode ser útil na avaliação diagnóstica e prognóstica do CB.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares de formulações baseadas em complexos metálicos derivados de BS e incorporado em um CLN com a imunoterapia com BCG na progressão do CBNMI induzido em ratos, bem como estabelecer os efeitos dessas estratégias terapêuticas envolvendo uma proteína estrutural, uma enzima formadora de EROs, as vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular, o balanço angiogênico e antiangiogênico.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar os complexos *N*-Salicilideno Anilina(níquel) [Salan(Ni)] e *N*-Salicilideno Anilina(platina) [Salan(Pt)] derivados da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan);
- Caracterizar os compostos sintetizados por: análise elementar (CHN); espectroscopia no infravermelho (FTIR); termogravimetria (TG); medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C;
- Avaliar a atividade *in vitro* dos compostos sintetizados;
- Caracterizar a histopatologia do CBNMI de ratos induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente às imunoterapias intravesicais com BCG e formulações dos complexos sintetizados;
- Caracterizar e comparar por meio de WB o envolvimento das imunoterapias intravesicais utilizando BCG e formulações dos complexos metálicos de Ni e Pt sintetizados com a organização e a distribuição da proteína estrutural do urotélio (UPIII), a enzima formadora de EROs (NOX4), os fatores indutores e reparadores de lesão celular (p53 e PTEN), o balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e endostatina) no CBNMI quimicamente induzido em ratos;
- Desenvolver um CLN contendo complexo Salan(Pt) através do sistema de agitação mecânica;
- Caracterizar a formulação nanoestruturada Salan(Pt)-CLN através das determinações do diâmetro de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA);
- Avaliar a estabilidade do Salan(Pt)-CLN através das determinações do diâmetro de partícula, PDI e potencial zeta durante 35 dias, sendo avaliada semanalmente;

- Caracterizar a histopatologia do CBNMI de ratos induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente às imunoterapias intravesicais com BCG, complexos Salan(Ni) e Salan(Pt) (utilizando 2% de DMSO em óleo de milho como veículo) e Salan(Pt)-CLN;
- Caracterizar e comparar os efeitos das imunoterapias intravesicais com BCG, formulações dos compostos Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN sobre os fatores indutores e reparadores de lesão celular (Akt, PI3K e p53), bem como o balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e endostatina) por WB no CBNMI em ratos induzidos quimicamente.

4. RESULTADOS

Nesta tese, os resultados obtidos foram divididos em três capítulos e estão apresentados em formato de artigos científicos como descritos:

4.1. Capítulo I: “Síntese, Caracterização do Novo Complexo *N*-Salicilideno Anilina(platina) e Atividade Antitumoral *in vitro* do Complexo *N*-Salicilideno anilina(níquel) Derivados de Base de Schiff”.

4.2. Capítulo II: “Avaliação dos Efeitos da Administração Intravesical de Complexos Derivados da Base de Schiff *N*-Salicilideno Anilina na Progressão do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI)”.

4.3. Capítulo III: “Novas Terapias Baseadas em Complexos tipo Salan Lipofílicos e Carreador Lipídico Nanoestruturado para o Tratamento do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI)”.

**4.1. Capítulo I: Síntese, Caracterização do Novo Complexo *N*-Salicilideno
Anilina(platina) e Atividade Antitumoral *in vitro* do Complexo *N*-Salicilideno
Anilina(níquel) Derivados de Base de Schiff**

**Mirian Y. Matsumoto¹; Manoel D. S. Neto²; Ana C. S. de Souza²; Nelson L. de C.
Domingues³; Andrelson W. Rinaldi⁴; Wagner J. Fávaro^{1*}**

¹ **Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.**

² **Laboratório de Prospecção e Caracterização de Bioativos, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil.**

³ **Laboratório de Catálise e Biocatálise Orgânica, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.**

⁴ **Laboratório de Química de Materiais e Sensores, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.**

Apoio financeiro: FAPESP, processo nº 2013/04708-8.

*Autor correspondente: Wagner J. Fávaro - Ph.D., Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Telefone / fax: +55 19 3521 6104; e-mail: wjfavaro@gmail.com

Resumo

Novos fármacos à base de metais têm sido desenvolvidos devido ao sucesso clínico da cisplatina e seus derivados. Complexos metálicos constituídos de bases de Schiff (BSs) apresentam significativa atividade antineoplásica. O interesse no desenvolvimento e caracterização de complexos contendo como ligantes BSs assimétricas com íons de metais de transição é justificado pelo fato de que, em sistemas naturais, são encontrados ligantes assimétricos coordenados à pelo menos um íon metálico central. Sabe-se que a existência de íons metálicos ligados a compostos biologicamente ativos pode aumentar suas atividades. A variedade de possíveis complexos metálicos derivados de BSs oportuniza o desenvolvimento desta pesquisa, pois várias são as possibilidades de aplicação desses materiais. Neste trabalho, objetivou-se sintetizar e caracterizar os complexos de níquel [Salan(Ni)] e platina [Salan(Pt)] derivados da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan) e testar o efeito citotóxico do complexo Salan(Ni). Os resultados das caracterizações obtidos indicaram a formação das estruturas propostas para o ligante e complexos. O complexo Salan(Ni) causou significativo efeito citotóxico em culturas de células de leucemia mielóide crônica (LMC) humana e de células de tumor hepático humano e de rato.

Palavras-chave: Base de Schiff, *N*-Salicilideno anilina, Leucemia Mielóide, Tumor hepático.

1. Introdução

A cisplatina [*cis*-diamino-dicloro-platina (II)] foi um dos primeiros fármacos antitumorais à base de metais descobertos no início do século XIX (Che & Siu, 2010) e, desde então, tornou-se um dos agentes antineoplásicos mais utilizados e eficazes (Proetto *et al.*, 2012). Ainda hoje, os fármacos à base de platina, como a cisplatina e a carboplatina, desempenham um papel importante na quimioterapia do câncer (Proetto *et al.*, 2012). A cisplatina exerce seu efeito antineoplásico através da ligação covalente com o DNA formando adutos que interferem na transcrição e replicação do DNA, desencadeando assim a morte celular programada (Che & Siu, 2010). No entanto, várias desvantagens especificamente relacionadas à toxicidade geral que leva a efeitos secundários indesejáveis e à fenômenos de resistência aos fármacos limitam o seu uso clínico (Proetto *et al.*, 2012). Essas restrições e o fato de algumas doenças tumorais não serem sensíveis a agentes de platina forçaram o desenvolvimento de novos agentes antitumorais, combinando platina (II) com ligantes carreadores adequados (Proetto *et al.*, 2012).

Desta maneira, as bases de Schiff (BSs) têm despertado grande interesse na química inorgânica medicinal devido à sua diversidade de atividades biológicas, farmacológicas, antitumorais e por desempenharem um papel importante como ligantes quelantes (Arjmand *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2013; Topal *et al.*, 2007). As BSs pertencem a uma enorme classe de compostos orgânicos caracterizados por conterem um grupo imina (-CH=N-) nas suas estruturas e são formadas a partir da condensação entre aminas primárias e aldeídos (Bharti *et al.*, 2010; Golcu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011). Essas bases são capazes de estabilizar muitos metais em estados de oxidação diferentes e coordená-los através do par de elétrons do átomo de nitrogênio do grupo imina, assim como também de outros grupos (Cozzi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que os ligantes BSs livres apresentam menos ou nenhuma atividade antibacteriana e antitumoral em comparação com os

seus complexos metálicos (Arjmand *et al.*, 2011; Creaven *et al.*, 2010; Kajal *et al.*, 2013). Sharma *et al.* (2012) relatam que a quelação ou complexação provoca mudanças drásticas nas propriedades biológicas dos ligantes e também dos metais. A literatura relata que a complexação de elementos metálicos com substâncias inativas os torna ativos e que, a complexação de metais com fármacos ativos, acentua suas atividades e diminui os efeitos tóxicos (Iqbal *et al.*, 1999). Muitos trabalhos sugerem que a complexação pode ser a causa da cura de muitas doenças, incluindo câncer (Singh *et al.*, 2006). Assim, os complexos derivados de BSs e metais de transição podem representar alvos a serem explorados na busca de novos fármacos (You *et al.*, 2008).

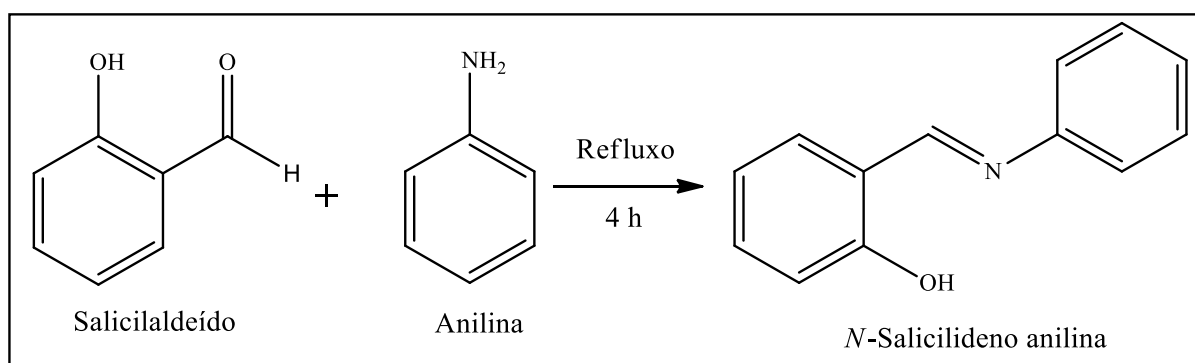
O níquel (Ni) é um elemento de interesse biológico em expansão, classificado como um elemento da primeira série de transição (Desbouis *et al.*, 2012; Skyrianou *et al.*, 2011) e pertence à mesma família da platina (Pt) na Tabela Periódica. Esse elemento não só está presente no centro ativo de algumas enzimas, mas também diversos complexos de Ni apresentam atividade biológica (Skyrianou *et al.*, 2011). Vários complexos de Ni apresentam diversas aplicações biológicas como antibacteriana (Xu *et al.*, 2011), antifúngica (Ali *et al.*, 2012), antimicrobiana (Gowda *et al.*, 2013), anticonvulsivantes, antiepilépticos ou vitaminas (Skyrianou *et al.*, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre a eficácia antitumoral do elemento Ni (Zhong *et al.*, 2006).

Assim, este trabalho teve como objetivo sintetizar a BS *N*-Salicilideno anilina (Salan) que subsequentemente foi utilizada como ligante para as sínteses dos complexos de Ni(II) e Pt(II). Esses compostos foram caracterizados utilizando Análise Elementar (CHN), FTIR, TG, RMN de ^1H e ^{13}C e, posteriormente foram realizados testes de citotoxicidade em células cultivadas.

2. Materiais e métodos

2.1. Síntese dos compostos

O ligante BS foi preparado pela reação de 3,1g de salicilaldeído com 2,36g de anilina (previamente bidestilada), os reagentes foram utilizados na razão molar de 1:1 e essa mistura foi mantida sob refluxo por um período de quatro horas. O precipitado obtido foi posteriormente filtrado a vácuo e recristalizado com etanol a quente, originando assim o ligante BS *N*-Salicilideno anilina (Salan). A síntese está representada no Esquema 1.

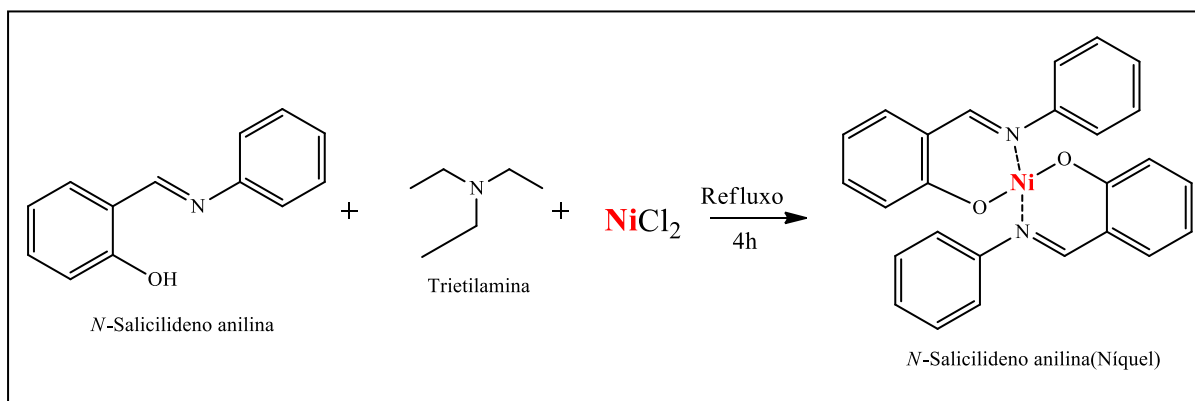


Esquema 1: Síntese do ligante *N*-Salicilideno anilina.

O ligante Salan sintetizado foi utilizado como composto partida nas sínteses dos complexos de Ni e Pt.

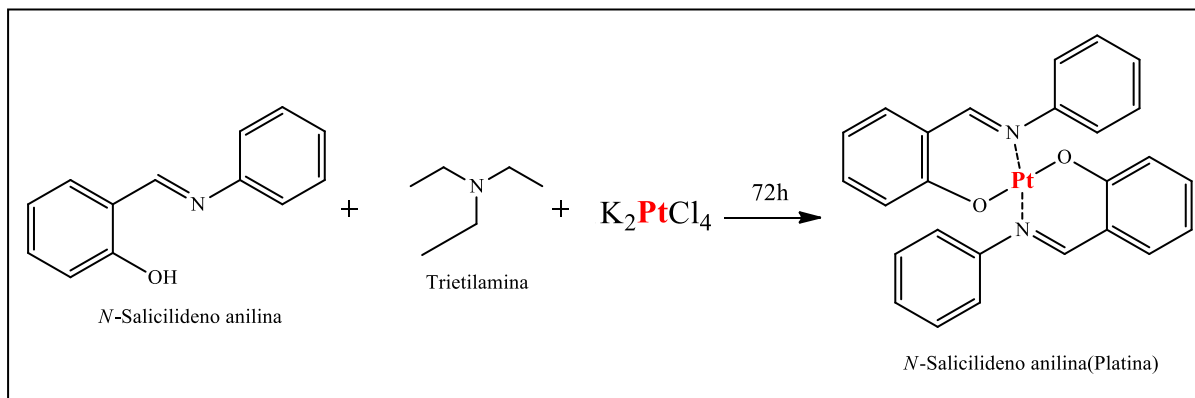
Na síntese do complexo *N*-Salicilideno anilina(níquel) [Salan(Ni)] utilizou-se 0,9 g do ligante Salan que foi solubilizado em 50 mL de etanol. A essa solução foi adicionado 0,64 mL de trietilamina. Posteriormente, adicionou-se à solução 0,29 g de cloreto de níquel (NiCl₂) solubilizado em etanol. Essa reação [razão molar ligante:metal de 2:1] foi agitada magneticamente e mantida sob refluxo durante quatro horas. Esse composto foi resfriado a temperatura ambiente, o que originou precipitados verdes, os quais foram filtrados e lavados

com etanol (para retirar o excesso de ligante) e água (para retirar o excesso de Cloreto de níquel). A síntese está representada no Esquema 2.



Esquema 2: Síntese do complexo *N*-Salicilideno anilina(níquel).

Para a síntese do complexo *N*-Salicilideno anilina(platina) [Salan(Pt)] foram utilizados 0,67 g do ligante Salan solubilizado em metanol. A essa solução foi adicionado 0,47 mL de trietilamina. Posteriormente, foi adicionado à solução 0,7 g de tetracloroplatinato(II) de potássio (K₂PtCl₄) solubilizado em água. Essa reação [razão molar ligante:metal de 2:1] foi agitada magneticamente durante 72h. O complexo sintetizado foi lavado com metanol e água. A síntese do complexo está representada no Esquema 3.



Esquema 3: Síntese do complexo *N*-Salicilideno anilina(platina).

2.2. Caracterizações dos compostos

2.2.1. Análise elementar (CHN)

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foram realizadas em um analisador elementar da Perkin Elmer modelo PE- 2400, no Instituto de Química da Unicamp.

2.2.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os espectros vibracionais no infravermelho foram registrados em espectrofotômetros de absorção I.V. FTIR Perkin Elmer Espectrun ONE, as medidas foram realizadas na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , na janela de erro de 4 cm^{-1} e as amostras foram dispersas em KBr grau espectroscópico.

2.2.3. Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas (TG) e termogravimetria derivada (DTG) foram realizadas utilizando um analisador termogravimétrico TGA 2050 (TA Instruments), em atmosfera inerte de Argônio (100 ml/min) com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, na temperatura até 1000°C.

2.2.4. Medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram registrados no espectrômetro (Bruker). Os espectros de RMN foram determinados em soluções de CDCl₃ como referência interna. Foi utilizada radiofrequência de 600 MHz para ¹H e ¹³C. Os valores de deslocamento químico foram atribuídos em parte por milhão (ppm). As áreas dos picos de RMN de ¹H foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas do seguinte modo: s: singlete, d: duplete, t: tripleto, m: multiplete.

2.3. Citotoxicidade in vitro

Os testes empregando cultura de células foram realizados com as linhagens celulares K-562, Lucena-1, HepG2 e HTC, que foram cultivadas em meio RPMI com SBF a 10% e adicionados 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina, mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram subcultivadas duas vezes por semana, e observados diariamente em microscópio óptico, para evitar a contaminação. A viabilidade celular das linhagens K-562, Lucena-1, HepG2 e HTC foram avaliadas após serem tratadas com os compostos: Salan, NiCl₂ e Salan(Ni), nas concentrações de: 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50 e 100 µM via redução de MTT. Utilizou-se a concentração final por poço de 0,3 mg/mL de

MTT e 100.000 cel./mL. Os testes foram realizados em placas de 96 poços: cada poço continha 100 µL de suspensão celular a 100.000 por mL e 50 µL do tratamento por 24h e 48h e por fim foram adicionados 50 µL de MTT por duas horas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi removido. Para solubilizar o formazan (produto da redução do MTT) adicionou-se 200 µL de DMSO e agitados em um shaker por 10 minutos, e então foram realizadas as leituras em um leitor de ELISA em comprimento de onda de 570 nm. No gráfico foi usado desvio padrão na estatística.

3. Resultados

3.1. *Análise elementar (CHN)*

A estequiometria do ligante Salan e seus complexos Salan(Ni) e Salan(Pt) foram confirmados através da análise elementar (CHN). Os dados analíticos obtidos estão de acordo com aqueles calculados para a fórmula que foi sugerida para o ligante e seus complexos. A razão de ligante:metal foi observada na proporção de 2:1, valores estimados pelos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio do ligante e complexos. Os resultados das análises elementares (C, H, N), assim como as fórmulas moleculares estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de análise elementar (CHN) dos compostos.

Análise elementar encontrada (calculada) (%)				
Composto	Fórmula molecular	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio
Salan	C ₁₃ H ₁₁ NO	79,26 (79,2)	5,75 (5,58)	7,18 (7,1)
Salan(Ni)	C ₂₆ H ₂₀ N ₂ O ₂ Ni	69,06 (69,24)	4,43 (4,43)	6,2 (6,2)
Salan(Pt)	C ₂₆ H ₂₀ N ₂ O ₂ Pt	49,29 (53,15)	3,62 (3,43)	4,61(4,76)

3.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As principais frequências na região do infravermelho da BS Salan e seus correspondentes complexos metálicos Salan(Ni) e Salan(Pt) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Dados espectrais de FTIR (cm⁻¹) do ligante e dos respectivos complexos.

Composto	v(H ₂ O)	v(O-H)	v(CH=N)	v(C-O)	v(M-N)	v(M-O)
Salan	3448	2886	1615	1274	-	-
Salan(Ni)	3434	-	1605	1328	555	464
Salan(Pt)	-	-	1605	1318	547	476

M: Ni ou Pt.

Na Figura 1 estão representados os espectros de infravermelho do ligante Salan e dos complexos Salan(Ni) e Salan(Pt). A banda em aproximadamente 2886 cm⁻¹ no espectro do ligante é atribuída à vibração do grupo OH fenólico (posição *orto*). Essa baixa frequência resulta da ligação intramolecular de OH com o átomo de nitrogênio do grupo CH=N (OH··N) (Golcu *et al.*, 2005; Sallam & Orabi, 2002). Essa banda não é observada nos espectros dos complexos, como resultado da desprotonação do grupo hidroxila e consequente coordenação com os metais Ni e Pt. Nos espectros do ligante Salan e do complexo Salan(Ni) são

observadas bandas em torno de 3448 e 3434 cm^{-1} , respectivamente, que são atribuídas por Majumder *et al.* (2006) à presença de moléculas de água de hidratação.

O ligante Salan apresenta uma banda forte em torno de 1615 cm^{-1} atribuída à vibração do grupo imina (-CH=N-). Como resultado da coordenação, essa banda desloca para menores números de onda, aparecendo em frequências em torno de -10 cm^{-1} mais baixas nos complexos e essas alterações nas frequências indica que o átomo de nitrogênio da imina coordenou-se aos íons metálicos (Tamizh *et al.*, 2009). A banda de média intensidade na região 1274 cm^{-1} , que é atribuída a $\nu(\text{C-O})$ fenólico no ligante livre, sofre deslocamentos de 44 e 54 cm^{-1} para maiores números de onda nos complexos, sugerindo o envolvimento do átomo de oxigênio fenólico na coordenação aos íons de Ni e Pt (Sallam & Orabi, 2002; Tamizh *et al.*, 2009). Duas novas bandas aparecem nas regiões de baixas frequências, em torno de 555-547 cm^{-1} , 464-476 cm^{-1} , nos espectros dos complexos e são atribuídas por Abid *et al.* (2016) à $\nu(\text{M-N})$ e $\nu(\text{M-O})$, respectivamente.

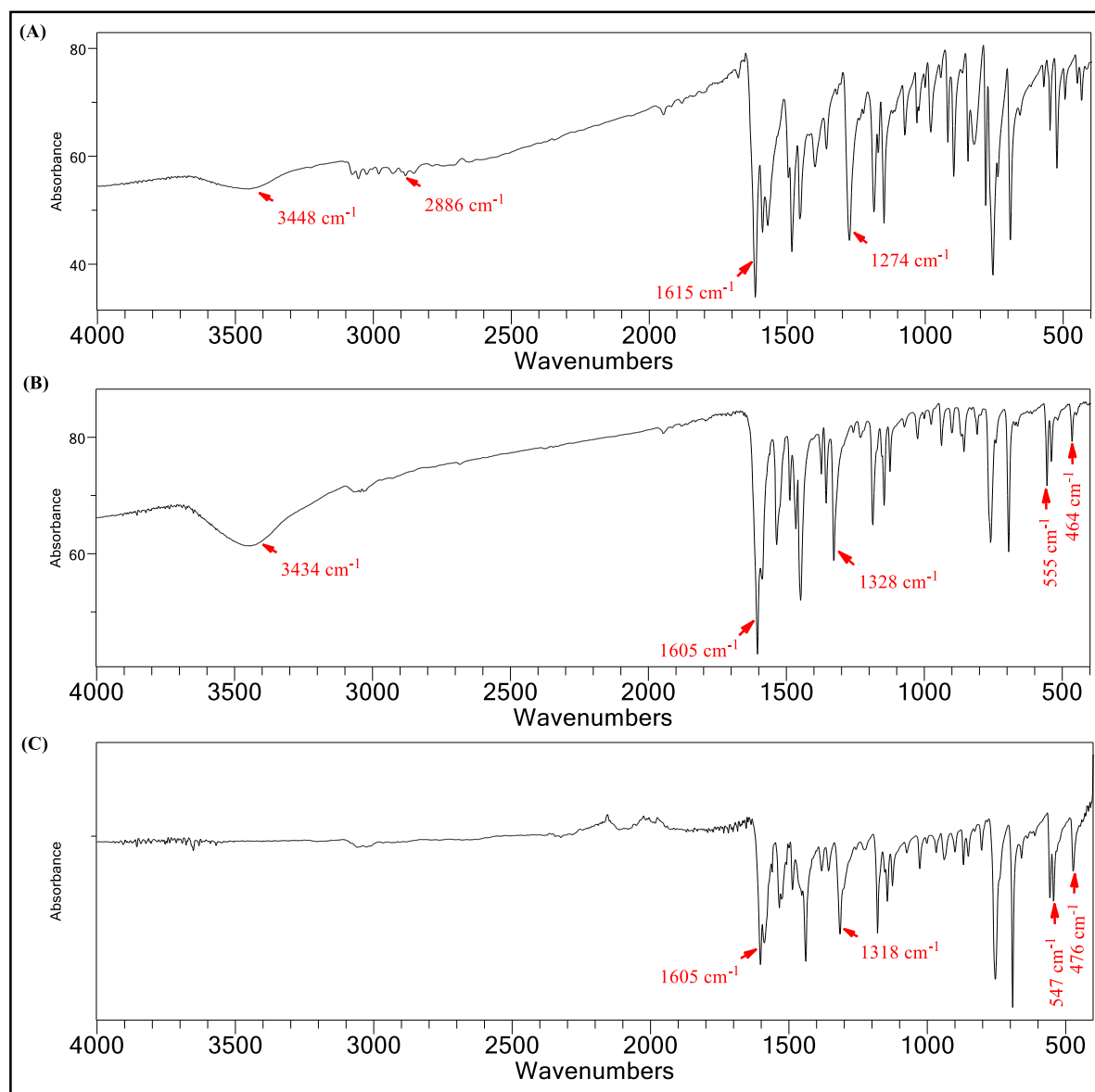


Figura 1: Espectros de FTIR do ligante Salan (A) e seus correspondentes complexos Salan(Ni) (B) e Salan(Pt) (C).

3.3. Termogravimetria (TG)

Os resultados termogravimétricos dos compostos sintetizados forneceram informações adicionais sobre suas estabilidades térmicas e comportamentos de degradação térmica. Os dados obtidos referentes aos intervalos de temperatura e perdas de massa na reação de decomposição estão descritos na Tabela 3 e indicaram a formação das estruturas propostas.

Tabela 3: Dados de análise térmica do ligante Salan, peso 5,353 mg; e dos complexos Salan(Ni), peso 6,158 mg; e Salan(Pt), peso 6,376 mg.

Composto	Etapas	Intervalo TG (°C)	DTG _{max} (°C)	Espécies perdidas	Resíduo	Perda de massa (mg)	
						Encontrada	Calculada
Salan	1 ^a	100–196	192	C ₁₃ H ₁₁ NO	-	5,27	5,353
	Resíduo	-	-	-	-	0,083	0
Salan(Ni)	1 ^a	270–370	346	C ₂₆ H ₂₀	-	4,6	4,54
	2 ^a	370–678	638	N ₂ O ₂	-	0,8	0,82
	Resíduo	-	-	-	Ni	0,76	0,8
Salan(Pt)	1 ^a	286–340	330	C ₅ H ₅	-	0,7	0,71
	2 ^a	340–588	570	C ₇ H ₅	-	0,975	0,97
	3 ^a	710–874	864	C ₁₂ H ₈	-	1,651	1,65
	Resíduo	-	-	-	C ₂ H ₂ Pt N ₂ O ₂	3,05	3,051

As curvas TG e DTG da BS Salan (Figura 2A e 2B) indicaram que este ligante exibe um padrão termolítico de uma etapa. A decomposição do ligante livre começa em torno de 100°C e termina em aproximadamente 196°C (máximo de 192°C) com perda do peso total, a perda de massa pode ser devida à perda sucessiva de C₁₂H₁₁NO na faixa de temperatura indicada (Tyagi *et al.*, 2015).

As curvas de TG e DTG do complexo Salan(Ni) estão representadas nas Figuras 2C e 2D onde é possível observar que este complexo sofre decomposição em duas etapas e apresenta estabilidade até 270°C, portanto não é observada a presença de molécula de água ligada ao complexo (Hossain *et al.*, 2016). Após essa temperatura o complexo começa a perder a molécula da BS em duas etapas (Mondal *et al.*, 2001), entre 270-370°C e 370-678°C, com máximos à 346 e 638°C. Nenhuma perda de peso adicional pode ser observada acima de

678°C e o resíduo final apresenta um peso constante correspondente ao metal Ni (Abid *et al.*, 2016).

Nas Figuras 2E e 2F estão representadas as curvas de TG e DTG do complexo Salan(Pt), onde observa-se uma natureza diferente, mais complexa nos termogramas. O complexo apresentou estabilidade térmica até 286°C, portanto, sugere-se a ausência de molécula de água ligada a esse complexo (Hossain *et al.*, 2016). Ao analisar as curvas de TG do complexo Salan(Pt) é possível observar que a decomposição acontece em três etapas: a 286-340°C, 340-588°C e 710-874°C, com máximos de 330, 570 e 864°C. Nas primeira e segunda etapas os picos correspondem à perda dos anéis aromáticos derivados do salicilaldeído (Tyagi *et al.*, 2015). Na terceira e última etapa, ocorre uma perda de massa correspondente à decomposição dos anéis benzênicos derivados da anilina (Tyagi *et al.*, 2015). Em seguida, o complexo Salan(Pt) sofre decomposição contínua até 1000°C, sobrando a Pt coordenada aos grupos imina (-CH=N-) e C-O como resíduo. De acordo com Abdel-Latif *et al.* (2007) a parte orgânica dos complexos pode decompor-se em um ou mais passos, havendo a possibilidade da formação de um ou dois intermediários e esses intermediários podem incluir o íon metálico coordenado à uma parte da BS.

As perdas de massa dos compostos foram calculadas e comparadas com as obtidas a partir da determinação analítica do teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Verificou-se que essas perdas estavam de acordo com as fórmulas encontradas nas análises elementares (CHN).

Abdel-Latif *et al.* (2007) ainda atribuem as temperaturas iniciais de decomposição como indicativas da estabilidade térmica dos complexos e a menor temperatura relativa, que é atribuída à primeira etapa de decomposição nos complexos pode ser atribuída à presença de dois ligantes orgânicos em torno do íon metálico.

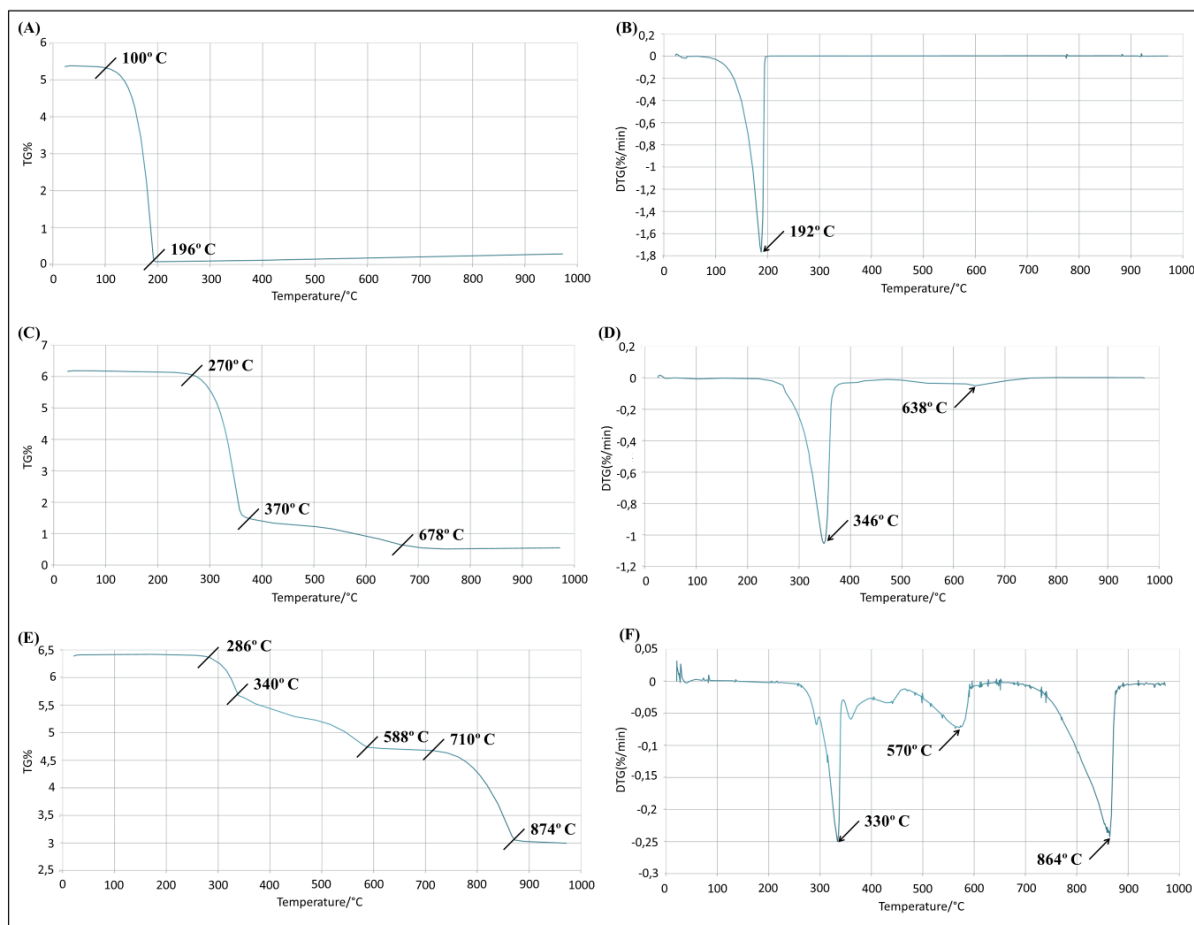


Figura 2: Termogramas de TG e DTG do ligante Salan (A, B) e dos complexos Salan(Ni) (C, D) e Salan(Pt) (E, F).

3.4. Medidas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C

Através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos foi possível identificar a presença de prótons e determinar o número total. Os dados espectrais dos compostos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Dados espectrais de RMN (ppm) do ligante e complexo Salan(Pt).

Composto	OH(s)	CH=N(s)	HC=N	C-N	C-OH
Salan	13,31	8,6	161,2	148,54	162,7
Salan(Ni)	--	--	--	--	--
Salan(Pt)	-	8,06	163,97	150,03	159,65

s: singlete; - desaparecido; -- não determinado.

No espectro de RMN ^1H do ligante Salan (Figura 3A) o hidrogênio da ligação C-H do grupo imina (-CH=N-) aparece em torno de 8,6 ppm como um único sinal, sendo esse um singlete largo, cujo alargamento pode ser atribuído ao efeito quadrupolar do átomo de nitrogênio ao qual o hidrogênio está diretamente ligado (Silverstein *et al.*, 2005). No espectro do complexo Salan(Pt) esse pico sofre um deslocamento e aparece na faixa de 8,06 ppm, sendo importante notar que esse deslocamento químico é devido a interação dos pares de elétrons do nitrogênio com a Pt.

A exposição de ressonância devido ao próton fenólico OH aparece em cerca de 13,31 ppm, valor muito próximo ao do próton (OH) da BS sintetizada por Tas *et al.* (2010) em que esse sinal é observado em 13,32 ppm. Na Figura 3B está representado o espectro de RMN ^1H do complexo Salan(Pt) e como esperado o pico referente ao próton fenólico (OH) em cerca de 13,31 ppm não aparece nesse espectro, indicando a desprotonação do grupo hidroxila e a coordenação do átomo de oxigênio do ligante Salan à Pt.

É possível observar também os sinais que aparecem como multipletos nas regiões de 6,96-7,45 ppm e são atribuídos por Akila *et al.* (2013) aos átomos de hidrogênio dos anéis aromáticos do ligante Salan livre (Figura 3A). RMN ^1H δ (ppm): 13,31 (s, 1H), 8,6 (s, 1H), 6,96 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 7,3 (m, 3H), 7,45 (m, 4H). Os picos na região de 6,14-7,47 ppm aparecem como multipletos no complexo Salan(Pt) e levemente deslocados em relação ao

espectro do ligante, podendo ser atribuídos aos prótons dos anéis aromáticos (C-H) (Figura 3B). RMN ^1H (ppm): 8,06 (s, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,4 (m, 3H), 7,3 (m, 3H), 6,6 (m, 1H), 6,2 (m, 1H). É importante notar que não aparecem sinais significativamente intensos do composto de partida nesse espectro, o que indica a formação e pureza do complexo Salan(Pt).

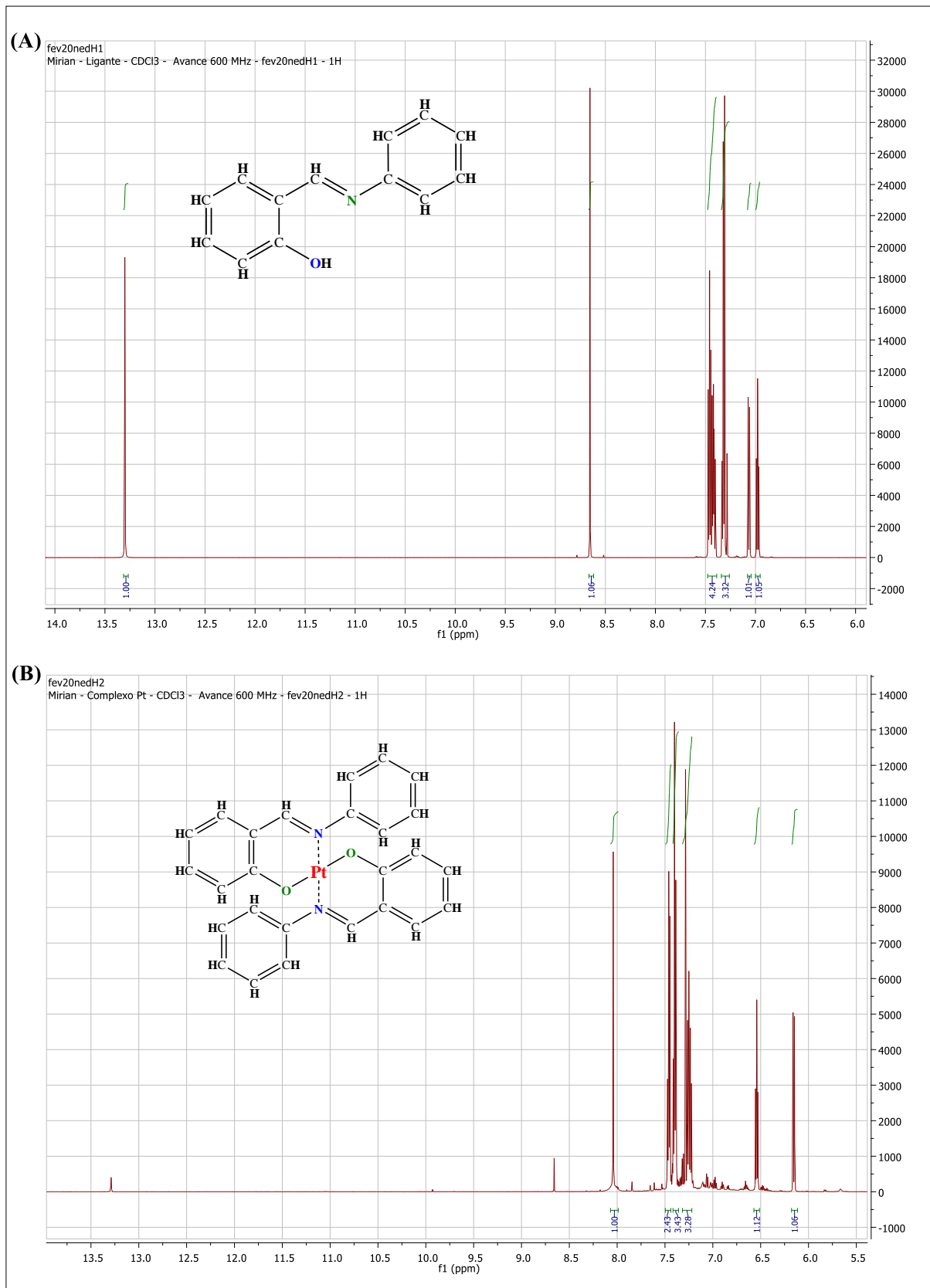


Figura 3: Espectro de RMN ¹H do ligante Salan (A) e complexo Salan(Pt) (B) em CDCl₃.

O espectro de RMN ^{13}C da BS Salan está representado na Figura 4A e ilustra os sinais que são atribuídos por Tamizh *et al.* (2009) aos diferentes átomos de carbono não-equivalentes em diferentes valores, sendo que nas regiões de 117,28 ppm a 133,17 ppm e os sinais referem-se aos átomos de carbono dos anéis benzênicos. No espectro de RMN ^{13}C do complexo Salan(Pt) representado na Figura 4B, esses sinais sofrem deslocamentos em relação ao ligante Salan livre e aparecem nas regiões de 116,21 ppm a 134,59 ppm.

Baseado nos relatos de Yeap *et al.* (2012) atribuiu-se o sinal observado em 161,2 ppm ao carbono que faz uma dupla ligação com o nitrogênio no grupo imina (-CH=N-), o sinal em 148,54 ppm é atribuído ao átomo carbono ligado ao átomo de nitrogênio (C-N) e o sinal em 162,7 ppm ao átomo de carbono diretamente ligado ao átomo de oxigênio e formador da ligação de hidrogênio (C-OH). Comparando-se o espectro do ligante Salan ao espectro do complexo Salan(Pt) nota-se que os sinais correspondentes as ligações CH=N, C-N e C-OH, sofrem deslocamentos, aparecendo em torno de 163,97 ppm, 150,03 ppm e 159,65 ppm no espectro do complexo e esses deslocamentos ocorrem devido a coordenação da Pt ao ligante Salan através do par de elétrons do nitrogênio e também através do átomo de oxigênio. Os valores observados no espectro do complexo de Pt referentes aos deslocamentos químicos dos carbonos nos grupos CH=N (161,2 ppm) e C-OH (159,65 ppm) foram muito próximos aos do trabalho de Al-Mogren *et al.* (2013) em que esses deslocamentos foram observados em 164.4 ppm e 160.8 ppm, respectivamente.

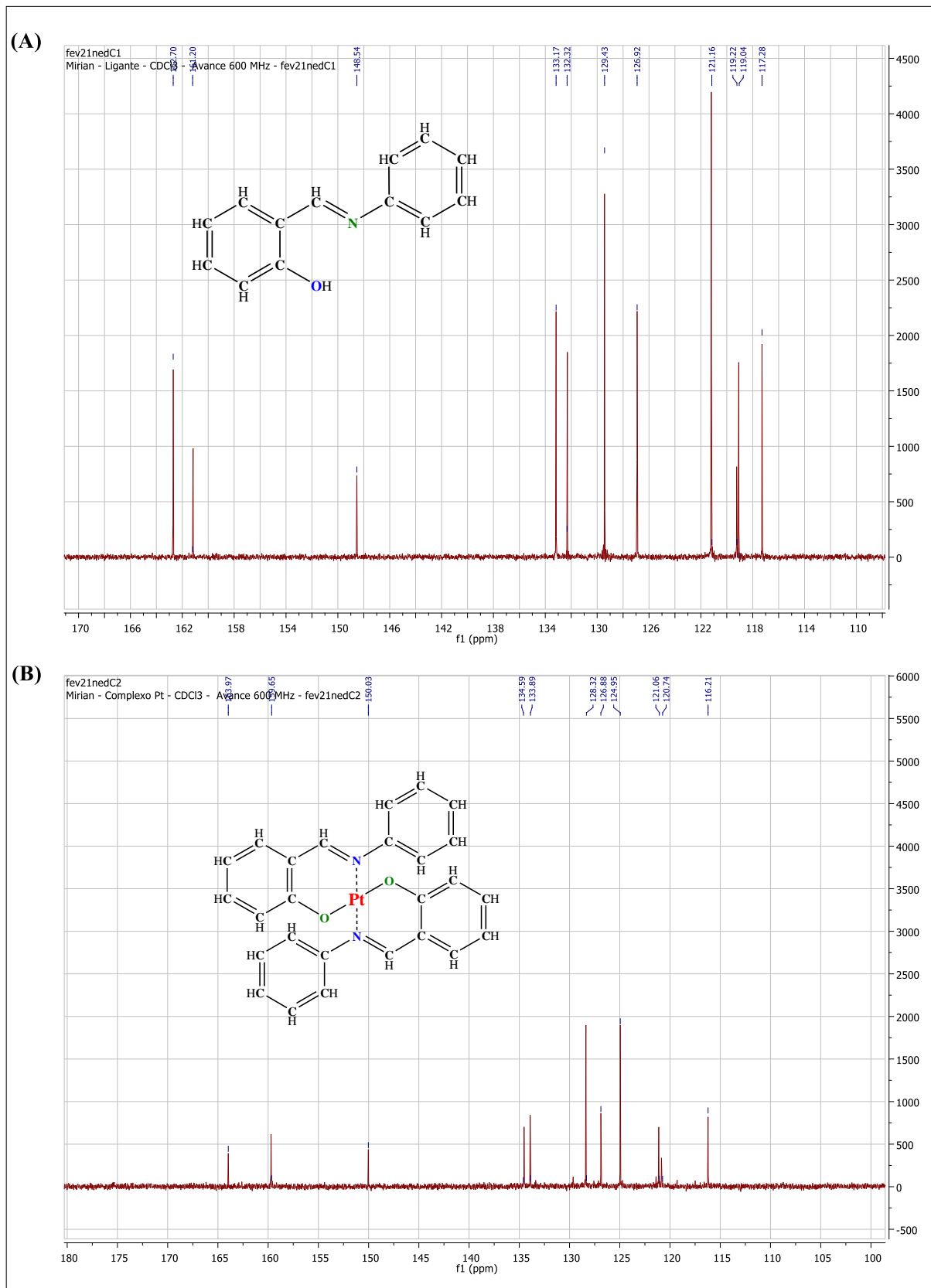


Figura 4: Espectro de RMN ¹³C do ligante Salan (A) e complexo Salan(Pt) (B) em CDCl₃.

3.5. Atividade citotóxica

O IC₅₀ é a concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células e os dados na Tabela 5 indicam os valores de IC₅₀ determinados *in vitro* para Salan, NiCl₂ e Salan(Ni) em linhagens celulares de leucemia mielóide crônica (K562), leucemia mielóide crônica resistente a múltiplas drogas (Lucena-1), tumor hepático humano HepG2 e tumor hepático de rato (HTC).

Tabela 5: Efeito de Salan, NiCl₂ e Salan(Ni) sobre células tumorais *in vitro* (valores de IC₅₀ em μM).

Composto	IC ₅₀			
	K562	Lucena-1	HepG2	HTC
Salan	-	-	-	-
NiCl ₂	50	50	-	-
Salan(Ni)	20	20	30	100

- não apresentou efeito citotóxico.

Os resultados indicaram que, embora o ligante Salan não apresente qualquer atividade sobre as linhagens de células de câncer K562 e Lucena-1, o complexo Salan(Ni) apresentou significativo efeito citotóxico dose-dependente sobre essas linhagens de células, com valores de IC₅₀ de 20 μM para ambas as linhagens, o que classifica esse complexo como quimioterapeuticamente significativo. Importante observar que apenas o NiCl₂ só apresentou efeito citotóxico a partir da concentração de 50μM.

Para testar o efeito dos compostos em outras linhagens de células de câncer, o potencial antitumoral do complexo Salan(Ni) foi avaliado utilizando-se as linhagens de tumor HepG2 e HTC. Os resultados obtidos demonstram que a exposição das células ao complexo

Salan(Ni) foi acompanhada por expressivo efeito citotóxico. De fato, o uso do complexo nas concentrações entre 30-100 μ M foi capaz de reduzir em mais 50% a viabilidade dessas células. Interessante notar que nem o NiCl₂ ou o ligante Salan não apresentaram atividade citotóxica quando utilizados de maneira isolada.

4. Discussão

Neste trabalho foram otimizadas rotas sintéticas nas quais foram obtidos os produtos desejados, com as estruturas propostas. Empregando-se o ligante Salan como composto partida foi possível desenvolver os complexos Salan(Ni) e Salan(Pt) e, posteriormente caracterizá-los. Os resultados de caracterizações permitiram confirmar a formação dos compostos propostos, assim como suas estruturas. Cumpre salientar que foi obtido um composto inédito, pois o complexo Salan(Pt) ainda não é reportado na literatura. Além disso, o presente trabalho apresentou resultados de uma nova aplicação do complexo Salan(Ni), onde os resultados obtidos foram positivos no emprego como agente antitumoral.

O exato mecanismo de ação desse complexo nas células tumorais ainda não é conhecido, porém Guerra *et al.* (2007) sugerem que essa atividade pode ser atribuída ao fato dos complexos derivados de BS apresentarem um ligante não abandonador, derivado de uma amina (anilina), que acompanha o complexo até o interior da célula onde o mesmo interage com o DNA. Além disso, é descrito na literatura que a toxicidade de uma grande variedade de complexos sobre células tumorais é devida ao seu efeito genotóxico, pois a integridade do DNA é afetada pelo centro metálico dos complexos através da formação de adutos com o DNA alvo (Miklášová *et al.*, 2012).

Raman *et al.* (2007) sintetizaram um complexo de Ni(II) a partir da BS derivada de 4-aminoantipirina, 3-hidroxi-4-nitrobenzaldeído e *o*-fenilenodiamina, e descobriram que o

complexo apresentou eficiente atividade nuclease, isto é, de clivagem do DNA através de química redox.

Xiao *et al.* (2008) sintetizaram um complexo de cobre de BS contendo *L*-glutamina e relatam que esse complexo é um inibidor do proteassoma em linhagens de células de leucemia e câncer de mama humanos. A inibição do proteassoma do tumor resultou no acúmulo de proteínas ubiquitinadas e a forma ubiquitinada de I κ B- α , um substrato de proteassoma natural, seguido por indução de apoptose.

Chakraborty *et al.* (2010) testaram a eficácia do complexo de cobre derivado de BS [Cu(Pyimpy)Cl₂] quanto ao seu potencial antitumoral. Verificou-se que [Cu(Pyimpy)Cl₂] apresentou efeito citotóxico em linhagens celulares MCF-7, PC3 e HEK 293, causando ainda a fragmentação do DNA *in vitro* em ensaios cometas e coloração com laranja de acridina de células MCF-7. [Cu(Pyimpy)Cl₂] foi ainda testado em modelos de tumores da mama de rato e verificou-se que inibiu o crescimento dos tumores, induziu apoptose nas células tumorais regulando positivamente a via das caspases e inibição de Akt, metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) e α -metil-acil CoA racemase (AMACR). As enzimas antioxidantes que em geral resultam em condições de resistência a fármacos em tecidos tumorais foram significativamente inibidas por [Cu(Pyimpy)Cl₂].

Assim, a descoberta da atividade citotóxica de Salan(Ni) é particularmente importante, com implicações para possível desenvolvimento desse complexo como uma nova droga antitumoral e, atualmente, estudos sobre o efeito desse complexo *in vivo* estão sendo realizados em nosso laboratório.

Referências

ABID, K. K.; AL-BAYATI, R. H.; FAEQ, A. A. Transition Metal Complexes of New N-Amino Quinolone Derivative; Synthesis, Characterization, Thermal Study and Antimicrobial Properties. *Am. J. Chem.*; v.6, pp.29-35, 2016.

ABDEL-LATIF, S.A.; HASSIB, H. B.; ISSA, Y. M. Studies on some salicylaldehyde Schiff base derivatives and their complexes with Cr(III), Mn(II), Fe(III), Ni(II) and Cu(II). *Spectrochim. Acta A*; v.67, pp.950-957, 2007.

AKILA, E.; USHARANI, M.; RAJAVEL, R. Metal (II) Complexes of Bioinorganic and Medicinal Relevance: Antibacterial, Antioxidant and DNA Cleavage Studies of Tetradentate Complexes Involving O,N-Donor Environment of 3,3'-Dihydroxybenzidine-Based Schiff Bases. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, v.5, pp.573-581, 2013.

AL-MOGREN, M. M.; ALAGHAZ, A.-N. M. A., EBRAHEM, E. A. Synthesis, spectroscopic, molecular orbital calculation, cytotoxic, molecular docking of DNA binding and DNA cleavage studies of transition metal complexes with *N*-benzylidene-*N'*-salicylidene-1,1-diaminopropane. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v.114, pp.695-707, 2013.

ALI, I.; WANI, W. A.; KHAN, A.; HAQUE, A.; AHMAD, A.; SALEEM, K.; MANZOOR, N. Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper(II) and nickel(II) complexes with conventional antifungals. *Microb. Pathog.*; v.53, pp.66-73, 2012.

ARJMAND, F.; SAYEED, F.; MUDDASSIR, M. Synthesis of new chiral heterocyclic Schiff base modulated Cu(II)/Zn(II) complexes: Their comparative binding studies with CT-DNA, mononucleotides and cleavage activity *J. Photochem. Photobiol.*; v.103, pp.166-179, 2011.

BHARTI, S. K.; NATH, G.; TILAK, R.; SINGH, S. K. Eur. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *J. Med. Chem.*; v.45, pp.651-660, 2010.

CHAKRABORTY, A.; KUMAR, P.; GHOSH, K.; ROY, P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur. J. Pharmacol.*; v. 647; pp.1-12, 2010.

CHE, C.-M. & SIU, F.-M. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. *Curr. Opin. Chem. Biol.*; v.14, pp.255-261, 2010.

COZZI, P. G. Metal–Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. *Chem . Soc. Rev.*; v.33, pp.410-421, 2004.

CREAVEN, B. S.; DUFF, B.; EGAN, D. A.; KAVANAGH, K.; ROSAIR, G.; THANGELLA, V. R.; WALSH, M. Anticancer and antifungal activity of copper(II) complexes of quinolin-2(1*H*)-one-derived Schiff bases. *Inorg. Chim. Acta*; v.363, 4048-4058, 2010.

DESBOUIS, D.; TROITSKY, I. P.; BELOUSOFFA, M. J.; SPICCIA, L.; GRAHAM, B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coord. Chem. Rev.*; v.256, pp.897-937, 2012.

GOLCU, A.; TUMER, M.; DEMIRELLI, H.; WHEATLEY, R. A. Cd(II) and Cu(II) complexes of polydentate Schiff base ligands: synthesis, characterization, properties and biological activity. *Inorg. Chim. Acta*; v.358, pp.1785-1797, 2005.

GOWDA, K. R. S.; NAIK, H. S. B.; KUMAR, B. V.; SUDHAMANI, C. N.; SUDEEP, H. V.; NAIK, T. R. R.; KRISHNAMURTHY, G. Synthesis, antimicrobial, DNA-binding and

photonuclease studies of Cobalt(III) and Nickel(II) Schiff base complexes. *Spectrochim. Acta Part A*; v.105, pp.229–237, 2013.

GUERRA, W.; SILVA, H.; ALMEIDA, M. V.; FONTES, A. P. S. Síntese e Caracterização de um Novo Complexo de Platina (IV) a Partir de seu Análogo de Platina (II) Utilizando Iodo Molecular como Agente Oxidante: uma Rota Sintética Interessante para Obtenção de Novos Complexos de Platina. *Quim. Nova*; v.30, pp.56-58, 2007.

HOSSAIN, S.; ISLAM, A.; ZAKARIA, C. M.; HAQUE, M. M.; MANNAN, A.; ZAHAN, K.-E. Synthesis, Spectral and Thermal Characterization with Antimicrobial Studies on Mn(II), Fe(II), Co(II) and Sn(II) Complexes of Tridentate N,O Coordinating Novel Schiff Base Ligand. *JCBPAT*; v.6, pp.041-052, 2016.

IQBAL, M. S.; AHMAD, A. R.; SABIR, M.; ASAD, S. M. Preparation, Characterization and Biological Evaluation of Copper(II) and Zinc(II) Complexes with Cephalexin. *J. Pharm. Pharmacol.*; v.51, pp.371-375, 1999.

JOSEPH, V.A.; VYAS, K. M.; PANDYA, J. H.; GUPTA, V. K.; JADEJA, R. N. Studies on DNA binding behavior of biologically active Cu(II) complexes of Schiff bases containing acyl pyrazolones and 2-ethanolamine. *J. Coord. Chem.*; v.66, pp.1094-1106, 2013.

KAJAL, A.; BALA, S.; KAMBOJ, S.; SHARMA, N.; SAINI, V. Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. *J. Catal.*; v.2013, pp.1-14, 2013.

MAJUMDER, A.; ROSAIR, GEORGINA M.; MALLICK, A.; CHATTOPADHYAY, N.; MITRA, S. Synthesis, structures and fluorescence of nickel, zinc and cadmium complexes with the N,N,O-tridentate Schiff base *N*-2-pyridylmethylidene-2-hydroxy-phenylamine. *Polyhedron*; v.25, pp.1753-1762, 2006.

MIKLÁŠOVÁ, N.; FISCHER-FODOR, E.; LÖNNECKE, P.; TOMULEASA, C. I.; VIRAG, P.; SCHREPLER, M. P.; MIKLÁŠ, R.; DUMITRESCU, L. S.; HEY-HAWKINS, E. Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells *in vitro*. *Eur J Med Chem.*; v.49, pp.41-47, 2012.

MONDAL, N.; MITRA, S.; GRAMILICH, V.; GHODSI, S. O.; MALIK, K. M. A. Synthesis, characterization and crystal structures of some four coordinated nickel(II) complexes with tridentate Schiff base ligands. *Polyhedron*; v.20, pp.135-141, 2001.

PROETTO, M.; LIU, W.; HAGENBACH, A.; ABRAM, U.; GUST, R. Synthesis, characterization and *in vitro* antitumour activity of a series of novel platinum(II) complexes bearing Schiff base ligands. *Eur. J. Med. Chem.*; v.53, 168-175, 2012.

RAMAN, N.; DHAVEETHU, R. J.; SAKTHIVEL, A. Synthesis, spectral characterization of Schiff base transition metal complexes: DNA cleavage and antimicrobial activity studies. *J. Chem. Sci.*; v.119, pp. 303–310, 2007.

SALLAM, S. A. & ORABI, A. S. Copper, nickel and cobalt complexes of Schiff-bases derived from β -diketones. *Transition Met. Chem.*; v.27, pp.447-453, 2002.

SINGH, K.; BARWA, M. S.; TYAGI, P. Synthesis, characterization and biological studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with bidentate Schiff bases derived by heterocyclic ketone. *Eur. J. Med. Chem.*; v.41, pp.147-153, 2006.

SHARMA, D.; KUMAR, P.; NARASIMHAN, B. Synthesis and antibacterial evaluation of Cu(II) and Zn(II) complexes of the β -lactum antibiotic, cefdinir. *Med. Chem. Res.*; v.21, pp.796-803, 2012.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. USA : John Wiley & Sons, 2005, 7^a, ISBN 0-471-39362-2.

SKYRIANOU, K. C.; PERDIH, F.; PAPADOPOULOS, A. N.; TUREL, I.; KESSISSOGLU, D. P.; PSOMAS, G. Nickel–quinolones interaction Part 5—Biological evaluation of nickel(II) complexes with first-, second- and third-generation quinolones. *J. Inorg. Biochem.*; v.105, pp.1273-1285, 2011.

TAMIZH, M. M.; MEREITER, K.; KIRCHNER, K.; BHAT, B. R.; KARVEMBU, R. Synthesis, crystal structures and spectral studies of square planar nickel(II) complexes containing an ONS donor Schiff base and triphenylphosphine. *Polyhedron*; v.28, pp.2157-2164, 2009.

TAS, E.; KILIC, A.; DURGUN, M.; KÜPECİK, L.; YILMAZ, I.; ARSLAN, S. Cu(II), Co(II), Ni(II), Mn(II), and Fe(II) metal complexes containing *N,N'*-(3,4-diaminobenzophenon)-3,5-But2-salicylalimine ligand: Synthesis, structural characterization, thermal properties, electrochemistry, and spectroelectrochemistry. *Spectrochim. Acta A*; v.75, pp.811–818, 2010.

TYAGI, P.; CHANDRA, S.; SARASWAT, B. S.; SHARMA, D. Design, spectral characterization, DFT and biological studies of transition metal complexes of Schiff base derived from 2-aminobenzamide, pyrrole and furan aldehyde. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*; v.143, pp.1-11, 2015.

TOPAL, G.; TÜMERDEM, R.; BASARAN, I.; GÜMÜS, A.; ÇAKIR, U. A Study of Complexation-ability of Neutral Schiff Bases to Some Metal Cations. *Int. J. Mol. Sci.*; v.8, pp.933-942, 2007.

WANG, Z.; GAO, J.; WANG, J.; JIN, X.; ZOU, M.; LI, K.; KANG, P. Spectroscopic analyses on interaction of Amantadine-Salicylaldehyde, Amantadine-5-Chloro-Salicylaldehyde and Amantadine-o-Vanillin Schiff-Bases with bovine serum albumin (BSA). *Spectrochim. Acta A*; v.83, pp.511-517, 2011.

XIAO, Y.; BI, C.; FAN, Y.; CUI, C.; ZHANG, X.; DOU, Q. P. *L*-glutamine Schiff base copper complex as a proteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cancer cells. *Int. J. Oncol.*; v.33, pp.1073-1079, 2008.

XU, Z.-H.; ZHANG, X.-W.; ZHANG, W.-Q.; GAO, Y.-H.; ZENG, Z.-Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and antibacterial activities of two tetranuclear cobalt(II) and nickel(II) complexes with salicylaldehyde 2-phenylquinoline-4-carboylhydrazone. *Inorg. Chem. Communications*; v.14, pp.1569-1573, 2011.

YEAP, G.-Y.; HENG, B.-T.; FARADIANA, N.; ZULKIFLY, R.; ITO, M. M.; TANABE, M.; TAKEUCHI, D. Synthesis, molecular structures and phase transition studies on benzothiazole-cored Schiff bases with their Cu(II) and Pd(II) complexes: Crystal structure of (E)-6-methoxy-2-(4-octyloxy-2-hydroxybenzylideneamino) benzothiazole. *J. Mol. Struct.*; v.1012, pp.1–11, 2012.

YOU, Z. L.; SHI, D. H.; XU, C.; ZHANG, Q.; ZHU, H. L. Schiff base transition metal complexes as novel inhibitors of xanthine oxidase. *Eur. J. Med. Chem.*; v.43, pp.862-871, 2008.

ZHANG, X.; BI, C.; FAN, Y.; CUI, Q.; CHEN, D.; XIAO, Y.; DOU, Q. P. Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff base copper complex is associated the with inhibition of proteasomal activity. *Int. J. Mol. Med.*; v.22, pp.677-682, 2008.

ZHONG, X.; YI, J.; SUN, J.; WEI, H.-L.; LIU, W.-S.; YU, K.-B. Synthesis and crystal structure of some transition metal complexes with a novel bis-Schiff base ligand and their antitumor activities. *Eur. J. Med. Chem.*; v.41, pp.1090-1092, 2006.

ZUO, J.; BI, C.; FAN, Y.; BUAC, D.; NARDON, C.; DANIEL, K. G.; DOU, Q. P. Cellular and computational studies of proteasome inhibition and apoptosis induction in human cancer cells by amino acid Schiff base–copper complexes *J. Inorg. Biochem.*; v.118, pp.83-93, 2013.

4.2. Capítulo II: Avaliação dos Efeitos da Administração Intravesical de Complexos Derivados da Base de Schiff *N*-Salicilideno Anilina na Progressão do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

Mirian Y. Matsumoto¹; Ana C. da S. Lima¹; Ana B. M. V. da Rocha¹; Patrick V. Garcia¹; Andrelson W. Rinaldi²; Wagner J. Fávaro^{1*}

¹ Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

² Laboratório de Química de Materiais e Sensores, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

Apoio financeiro: FAPESP, processo nº 2013/04708-8.

*Autor correspondente: Wagner J. Fávaro - Ph.D., Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Telefone / fax: +55 19 3521 6104; e-mail: wjfavaro@gmail.com

Resumo

O câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) é um dos cânceres urológicos mais comuns, cujo tratamento é baseado na ressecção transuretral (RTU) da bexiga, seguida pela imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Porém, BCG causa complicações específicas em mais de 90% dos pacientes. Na busca por novos agentes, complexos metálicos derivados de bases de Schiff (BSs), como os complexos do tipo Salan são considerados potenciais quimioterápicos. Assim, este trabalho objetiva caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares de formulações dos complexos de níquel e platina com a imunoterapia com BCG na progressão do CBNMI. Nos resultados obtidos, o grupo tratado com o complexo Salan(Ni) apresentou melhores resultados sobre a progressão do CBNMI. Pelas análises de *Western blotting* (WB), o tratamento com o complexo Salan(Ni) apresentou maior nível proteico de UP III, p53, PTEN e endostatina. Concluindo, o tratamento com complexo Salan(Ni) indicou uma boa recuperação histopatológica atribuída ao alto nível proteico de UPIII, demonstrou a natureza cooperativa entre p53 e PTEN indicando melhoras nas funções supressoras de tumor e a inibição da angiogênese atribuída ao elevado nível proteico de endostatina e baixo nível de VEGF.

Palavras-chave: Câncer de bexiga, *N*-Salicilideno anilina, Níquel, BCG.

1. Introdução

O câncer de bexiga (CB) é considerado um dos cânceres urológicos mais comuns (Glas *et al.*, 2003). Clinicamente, podem distinguir-se dois grandes grupos de CB, câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) e câncer de bexiga músculo-invasivo (CBMI), sendo o segundo grupo considerado uma doença potencialmente fatal para a qual é recomendada uma cistectomia (Compérat & Kwast, 2013). O CBNMI representa o tipo mais comum de CB (Kassouf *et al.*, 2016). O tratamento primário do CBNMI de alto grau é baseado na ressecção transuretral (RTU) da bexiga, seguida pela imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Garcia *et al.*, 2016). Porém BCG causa complicações específicas em mais de 90% dos pacientes sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (Bhöle & Brandau, 2003; Kaufman *et al.*, 2009; Lamm *et al.*, 1986; Sylvester *et al.*, 2002).

Atualmente, têm-se buscado desenvolver novas terapias que apresentem menos efeitos secundários e que aumentem o espectro de atividade através de uma melhor distribuição do fármaco para alvos específicos (Ruiz *et al.*, 2011). Cada vez mais a busca por novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer tem aumentado, despertando expectativas para desenvolver terapias mais específicas e que substitua a quimioterapia tradicional (Dogan *et al.*, 2014; Filomeni *et al.*, 2007). Assim, complexos metálicos derivados de bases de Schiff (BSs) são considerados potenciais quimioterápicos e seus efeitos têm sido amplamente estudados em vários tipos de câncer (Hajrezaie *et al.*, 2015). Devido a sua alta bioatividade os complexos metálicos derivados de BSs são extensivamente estudados como agentes antineoplásicos (Zhang *et al.*, 2012). Acredita-se que o átomo metálico central, semelhanças estruturais com substâncias biológicas naturais e a presença do grupo imina (-N=CH-) conferem a atividade biológica desses compostos (Rama & Selvameena, 2015). Porém, os

efeitos citotóxicos dos complexos metálicos derivados de BSs são amplamente estudados apenas em testes *in vitro* (Baul *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2016; Qiao *et al.*, 2011) e trabalhos que relatam a atividade antineoplásica desses compostos *in vivo* ainda são insuficientes.

Dessa forma, este trabalho visa caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares de formulações dos complexos metálicos com a imunoterapia com BCG na progressão do CBNMI quimicamente induzido em ratos, bem como estabelecer os efeitos dessas estratégias terapêuticas envolvendo fatores indutores e reparadores de lesão celular, EROs e angiogênese.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparação da base de Schiff *N*-Salicilideno anilina e derivados

Utilizou-se anilina para reagir com salicilaldeído, produzindo assim o ligante BS *N*-Salicilideno anilina (Salan). Sintetizou-se então os complexos de níquel [Salan(Ni)] e platina [Salan(Pt)] correspondentes. Os processos sintéticos de Salan e correspondentes complexos de Ni e Pt estão descritos no Capítulo I.

2.2. Preparação dos tratamentos

A BCG foi diluída em solução fisiológica na concentração de 10^6 UFC de BCG (Fundação Atauilho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil).

Os complexos Salan(Ni) e Salan(Pt) bem como o próprio ligante Salan são insolúveis em água e, por esse motivo os tratamentos não puderam ser instilados em soluções aquosas. Assim, os compostos foram solubilizados em DMSO 10% e água 90%, porém os compostos

precipitaram ao adicionar a água. Estudos da atividade citotóxica de complexos derivados de BSs foram realizados utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como diluente (Abdulghani & Abbas, 2011; Helal *et al.*, 2010; Tabassum *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Assim, optou-se por solubilizar os compostos Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt) em DMSO.

2.3. Animais e procedimento experimental

2.3.1. Protocolo de indução do CBNMI

No presente trabalho foram utilizadas 30 ratas da linhagem Fischer 344, na faixa etária de quatro semanas, obtidas no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Esses animais foram alojados em gaiolas (2/3 ratas por gaiola) sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo invertido de 12 horas claro/escuro.

Para a indução do CBNMI, foi utilizado um protocolo padronizado por Fávoro *et al.* (2012) utilizando *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU) associado com solução de citrato de sódio administrado por via intravesical (Figura 1A – Anexo III) (Fávoro *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). Para a indução do CB urinária, 25 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/kg de *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU - Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 0,3 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Fávoro *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). Para os procedimentos de indução foi utilizada cabine de segurança classe II A2 (*The Baker Company, Sanford, ME, EUA*). Os 5 animais que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle**. Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram pesados

para observar possíveis variações que podem ser causadas pela indução e, posteriormente divididos em 5 grupos (5 animais cada):

- **Grupo 1: Controle:** recebeu uma dose intravesical de 0,2 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas;
- **Grupo 2: Câncer:** recebeu o mesmo tratamento que o grupo Grupo 1;
- **Grupo 3: BCG:** recebeu uma dose intravesical de 10^6 UFC – 40 mg de BCG (*Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil*) diluída em 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas (Fávaro *et al.*, 2012);
- **Grupo 4: Salan:** recebeu uma dose intravesical de 25 mg/kg da BS Salan diluída 0,2 mL de dimetilsulfóxido por 6 semanas consecutivas;
- **Grupo 5: Salan(Ni):** recebeu uma dose intravesical de 25 mg/kg de complexo Salan(Ni) dissolvido em 0,2 mL de dimetilsulfóxido por 6 semanas consecutivas;
- **Grupo 6: Salan(Pt):** recebeu uma dose intravesical de 25 mg/kg de complexo Salan(Pt) dissolvido em 0,2 mL de dimetilsulfóxido por 6 semanas consecutivas.

Ao instilar os tratamentos pela via intravesical observou-se mudanças de colorações das soluções de Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt) contidas nos cateteres e nas seringas e essas alterações foram devidas a ocorrência de precipitação desses compostos. Nas Figuras 1b e 1d é possível observar que ao adicionar urina na solução dos complexos em DMSO ocorre a precipitação dos mesmos.

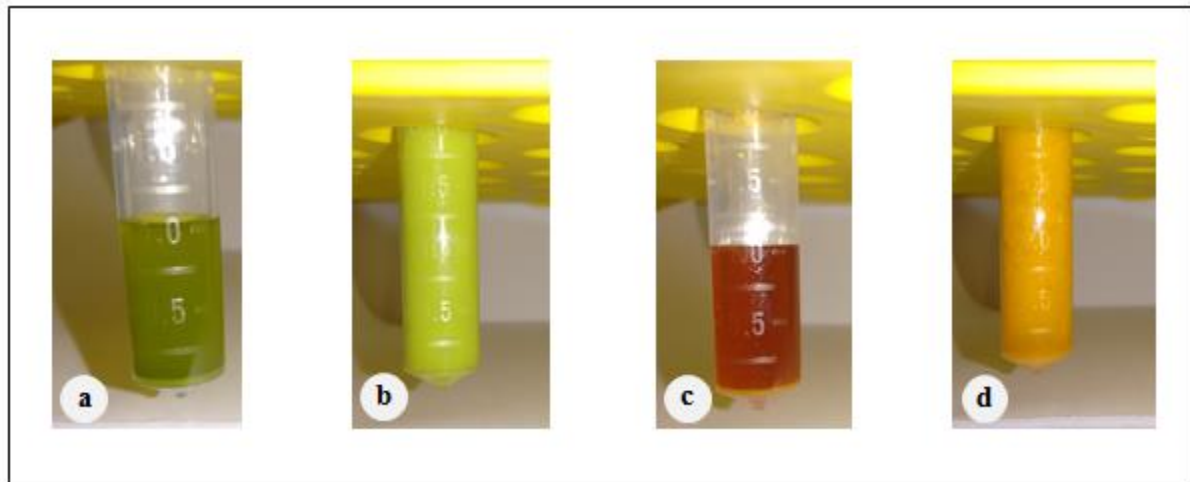


Figura 1: Salan(Ni) solubilizado em DMSO (a); Salan(Ni) solubilizado em DMSO e adicionada urina de rato com câncer (b); Salan(Pt) solubilizado em DMSO (c); Salan(Pt) solubilizado em DMSO e adicionada urina de rato com câncer (d).

As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (*Abocath, São Paulo, Brasil*). Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após 16 semanas de experimento os animais foram previamente anestesiados e em seguida eutanasiados por punção cardíaca. As bexigas urinárias foram retiradas (Figura 1B, C, D – Anexo III) e divididas em duas partes cada uma, sendo metade para ser submetida a processamento histológico com posterior análise histopatológica e outra metade apenas congelada para análise protéica por *Western blotting* (WB). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 3606-1 - CEUA – Anexo I) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

2.3.2. Análises histopatológicas

Foram coletadas as bexigas urinárias dos animais de todos os grupos e fixadas em Bouin. Decorridas 24 horas de fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70% e posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Após a desidratação, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, esses materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *Leica RM 2165 (Leica, Munique, Alemanha)* com espessura de 5µm, corados em hematoxilina-eosina (HE) e fotografados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha)*. Os animais dos diferentes grupos experimentais foram classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein *et al.*, 1998).

2.3.3. Determinação dos níveis proteicos da proteína estrutural do urotélio (UP III), da enzima formadora de EROs (NOX4), das vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (p53 e PTEN), do balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e Endostatina)

As bexigas urinárias dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coletadas, congeladas, extraídas e submetidas às análises de WB. Para a extração, essas bexigas urinárias foram homogeneizadas em tampão de extração contendo: Triton-x-1%; NaCl 150mM; Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; Hepes 1mM, pH 7,6; PMSF 0,2 mM e 10 µL/mL de coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*). Os extratos obtidos foram centrifugados durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Posteriormente, uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o micrométodo de *Bradford*. Foi utilizado o correspondente a 7 microgramas de proteínas, que

foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (GE Helthcare, Alemanha) e essas membranas foram bloqueadas com Rapid Block 10% diluído em água por 5 minutos com posterior incubação *overnight* com os anticorpos primários: monoclonal *mouse orb27370 (Biorbyt, EUA)* para UPIII, policlonal *rabbit orb11151 (Biorbyt, EUA)* para NOX4, policlonal *rabbit sc-6243 (Santa Cruz Biotechnology, EUA)* para p53, monoclonal *rabbit 138G6 (Cell Signaling Technology, EUA)* para PTEN, monoclonal *mouse sc 53462 (Santa Cruz Biotechnology, EUA)* para VEGF, policlonal *rabbit bs-0547R (Bioss, EUA)* para endostatina e monoclonal *mouse sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology, EUA)* para β -actina. Seguiu-se as etapas com lavagem utilizando-se tampão TBS-T e, então, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *Anti-rabbit* e *Anti-mouse* HRP conjugados diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *NIH ImageJ 1.47v (National Institute of Health, EUA)*. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

2.3.4. Análises estatísticas

As quantificações de membranas obtidas (análises de WB) foram analisadas estatisticamente nos diferentes grupos experimentais. Na análise estatística foram empregados o *Test-T* e a análise de variância (*one-way ANOVA*), foi realizado o teste de Tukey *post hoc* para comparação entre médias. As análises foram realizadas com nível de significância de 1% a 5% e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados

histopatológicos foram avaliados através do teste de proporção Qui-Quadrado. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Análises histopatológicas

Na Tabela 1 estão apresentados os diagnósticos das alterações histopatológicas nas bexigas urinárias dos animais dos grupos Controle, Câncer, BCG, Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt).

Tabela 1: Porcentagem de alterações histopatológicas nas bexigas urinárias dos animais dos grupos Controle, Câncer, BCG, Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt).

<i>Histopatologia</i>	Grupos						Lesão
	Controle	Câncer	BCG	Salan	Salan(Ni)	Salan(Pt)	
<i>Normal</i>	05 (100%)	-	-	-	-	-	-
<i>Hiperplasia Plana</i>	-	-	-	-	-	-	Benigna
<i>Hiperplasia Papilífera</i>	-	-	-	-	-	-	Benigna
<i>Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau</i>	-	-	-	-	-	-	Pré-maligna
<i>Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma in situ (pTis)</i>	-	-	-	-	01 (20%)	-	Maligna
<i>Carcinoma Papilífero de baixo grau (pTa)</i>	-	-	03 (60%)	01 (20%)	02 (40%)	-	Maligna
<i>Carcinoma Papilífero de alto grau (pTa)</i>	-	02 (40%)	02 (40%)	-	01 (20%)	01 (20%)	Maligna
<i>Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)</i>	-	03 (60%)	-	04 (80%)	01 (20%)	04 (80%)	Maligna

Devido à necessidade de observar as alterações anatomopatológicas dos animais tratados em relação aos animais não tratados analisou-se primeiramente a histopatologia do grupo Controle (Figuras 2a e 2b). Ao comparar o trato urinário do grupo Controle ao trato urinário do grupo Câncer é possível observar alterações histopatológicas radicais como a presença de carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero de alto grau (pTa) e metaplasia escamosa associada a pTa foram observados na bexiga urinária em 60%, 40% e 20% dos animais do grupo Câncer, respectivamente (Figuras 2c e 2d). Nas fotomicrografias das bexigas urinárias dos animais tratados com BCG (Figuras 2e e 2f), observou-se que as alterações histopatológicas observadas foram carcinoma papilífero de

baixo grau (pTa) em 60% dos casos e carcinoma papilífero de alto grau (pTa) em 40% dos animais.

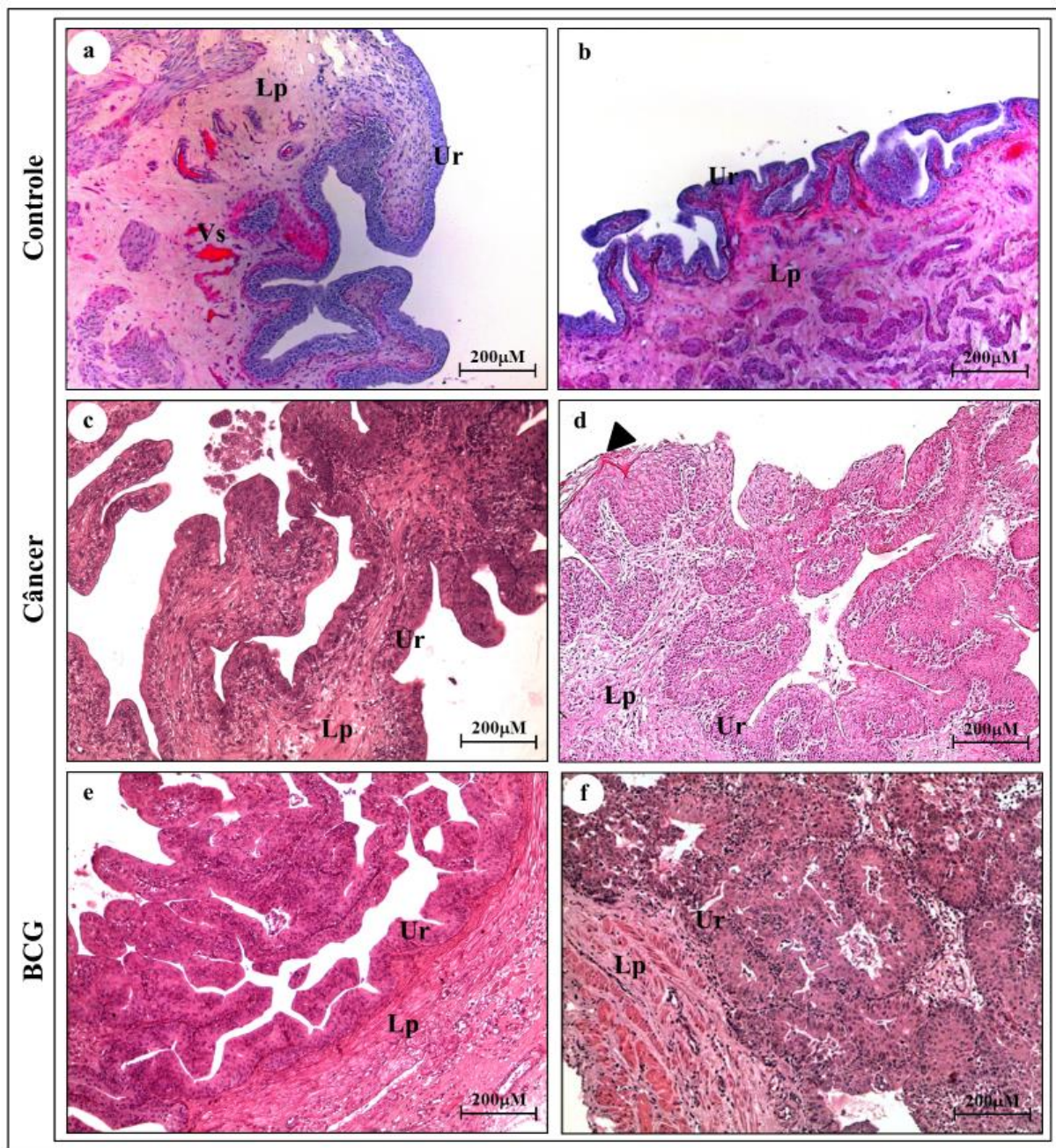


Figura 2: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas das bexigas urinárias dos grupos Controle (**Figuras a, b**), Câncer (**Figuras c, d**) e BCG (**Figuras e, f**). Histologia normal (**Figuras a, b**); Vasos sanguíneos (Vs) na lâmina própria (**Figura a**). Carcinoma papilífero de alto grau (pTa) (**Figuras c, d, e, f**). Metaplasia escamosa queratinizante: acúmulo abundante de material córneo (*cabeça de seta fechada*) (**Figuras d**). **Figuras a-f:** *Lp* – lâmina própria, *Ur* – urotélio.

Os animais tratados com o ligante Salan tiveram diagnóstico de carcinoma em estágio avançado, sendo carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (80%), carcinoma papilífero de baixo grau (20%) e 60% dos casos associados a metaplasia escamosa queratinizante (Figuras 3a e 3b). Nas fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas observadas nas bexigas urinárias dos animais tratados com o complexo Salan(Ni) (Figuras 3c e 3d) as lesões foram classificadas como pTa de baixo grau (40%), pTa de alto grau (20%), pTis (20%) e pT1 (20%). Nos animais tratados com complexo Salan(Pt) (Figuras 3e e 3f) as alterações histopatológicas observadas nas bexigas urinárias foram carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria em 80% dos casos, carcinoma papilífero de alto grau em 20% dos casos e metaplasia escamosa queratinizante associada a 40% dos casos.

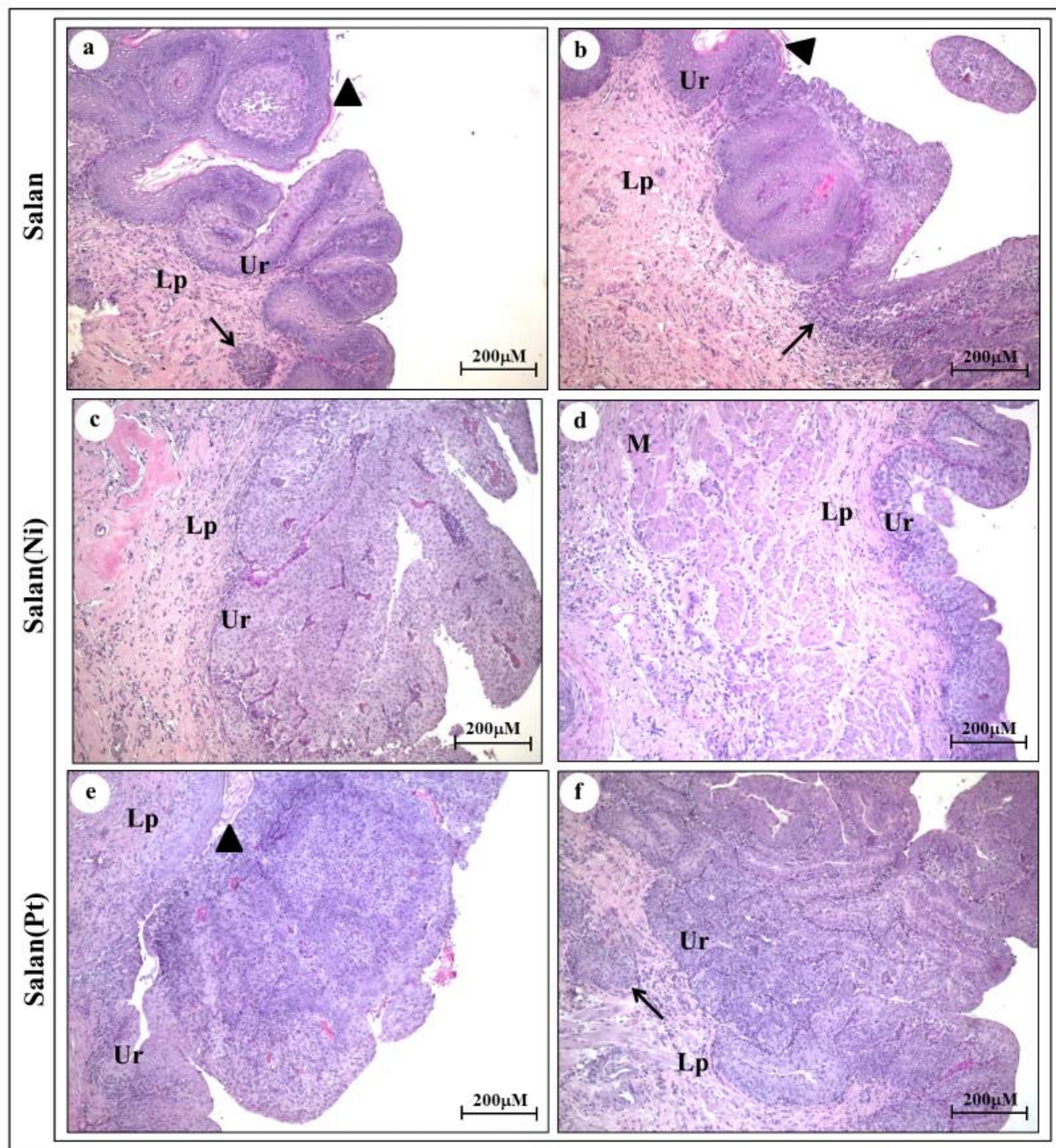


Figura 3: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas das bexigas urinárias dos grupos Salan (**Figuras a, b**), Salan(Ni) (**Figuras c, d**) e Salan(Pt) (**Figuras e, f**). Carcinoma *in situ* (pTis) (**Figura d**). Carcinoma papilífero de alto grau (pTa) (**Figuras c, e**). Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (*setas*) invadindo a lâmina própria (**Figuras a, b, f**). Metaplasia escamosa queratinizante: acúmulo abundante de material córneo (*cabeça de seta fechada*) (**Figuras a, b, e**). **Figuras a-f:** *Lp* – lâmina própria, *Ur* – urotélio. *M* – muscular própria (**Figura d**).

3.2. Determinação dos níveis proteicos da proteína estrutural do urotélio (UP III), da enzima formadora de EROs (NOX4), das vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (p53 e PTEN), do balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e Endostatina)

Na Figura 4A observa-se que os níveis proteicos de UPIII foram significativamente maiores nos grupos Salan(Ni) (54,28%) seguido dos grupos Salan (45,71%), BCG (44,36%), Câncer (42,49%) e Salan(Pt) (38,89%). O grupo Controle (27,58%) apresentou níveis proteicos de UPIII significativamente mais baixos.

Os níveis proteicos de NOX4 foram quantificados e estão representados na Figura 4B. Como esperado, o grupo Câncer (16,97%), apresentou significativamente o maior nível proteico de NOX4 seguido dos grupos Salan(Ni) (11,85%), Salan (10,78%), Salan(Pt) (9,39%), BCG (5,94%) e Controle (4,04%).

Os níveis proteicos de p53 e PTEN também foram quantificados nos diferentes grupos. Os grupos BCG (32,07%) e Salan(Ni) (31,15%) apresentaram significativamente maiores níveis proteicos de p53 em relação aos grupos Salan (26,92%) e Salan(Pt) (24,3%), sendo que nos grupos Controle (11,8%) e Câncer (11,67%) os níveis de p53 foram significativamente menores (Figura 4C). Em relação à PTEN, os grupos Salan(Ni) (44,42%) e Salan (42,74%) apresentaram níveis proteicos significativamente maiores, seguidos pelos grupos Salan(Pt) (34,86%), BCG (32,89%), Controle (21,02%) e Câncer (11,89%) (Figura 4D).

Como esperado, o nível de VEGF foi mais alto no grupo Câncer (42,04%) em comparação aos grupos Salan (30,1%), Salan(Ni) (29,79%), BCG (26,04%), Controle (19,53%) e Salan(Pt) (14,93%) (Figura 4E).

Em contrapartida, os níveis proteicos de endostatina foram significativamente mais altos nos grupos Salan (22,92%), Salan(Ni) (21,76%) e Salan(Pt) (19,01%). Nos grupos BCG (13,54%), Câncer (12,59%) e Controle (9,57%) foram observados níveis de endostatina significativamente menores (Figura 4F).

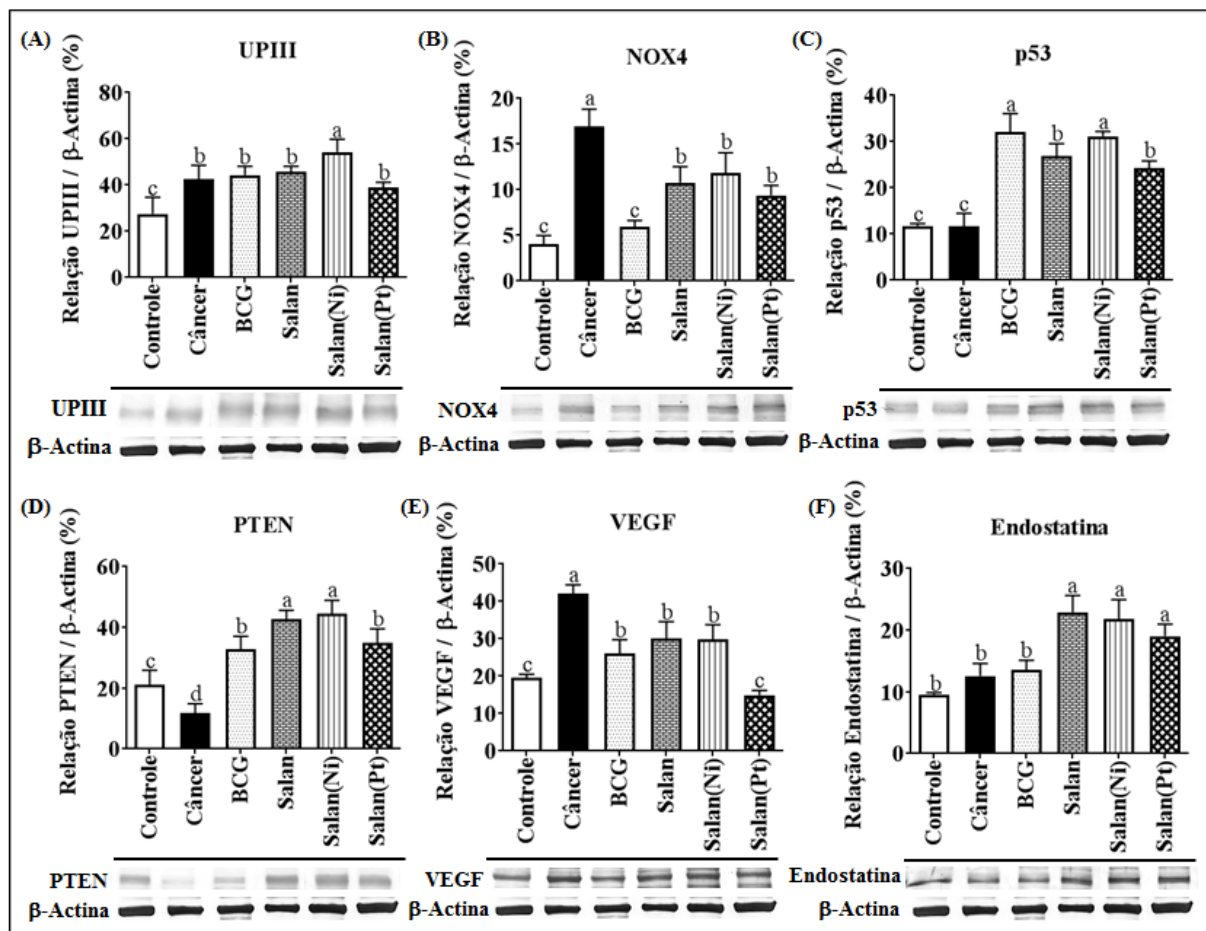


Figura 4: Representação do WB e determinação semi-quantitativa das proteínas UPIII (A), NOX4 (B), p53 (C), PTEN (D), VEGF (E) e endostatina (F) extraídas das bexigas urinárias dos grupos Controle, Câncer, BCG, Salan, Salan(Ni) e Salan(Pt). Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β -actina foi usada como controle endógeno. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 05).

4. Discussão

Os resultados indicaram que apesar da ocorrência de precipitação dos compostos derivados da BS Salan durante a instilação na bexiga urinária, o tratamento com Salan(Ni) apresentou melhor recuperação histopatológica do CBNMI em relação aos demais tratamentos. Os CBNMIs são caracterizados por lesões dos tipos pTis, pTa e pT1 (Schenk-Braat & Bangma, 2005; Suttman *et al.*, 2006). No estágio pTis ou *in situ* observa-se uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia), em um urotélio plano, presença de numerosas atipias celulares onde é possível observar núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes. No carcinoma no estágio pTa, ou papilífero, pode-se observar extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos. O carcinoma pTa ainda pode ser classificado em baixo ou alto grau. Nos tumores de baixo grau o epitélio é predominantemente ordenado com poucas figuras mitóticas e nos tumores de alto grau observa-se o epitélio predominantemente desordenado com figuras mitóticas frequentes em todos os níveis do epitélio (Salmond, 2016). O carcinoma no estágio pT1 invade a lâmina própria e caracteriza-se por evidentes células neoplásicas aglomeradas em pequenos grupos ou cordões invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos maiores.

Os casos de CB podem ou não estarem associados à metaplasia escamosa. De acordo com Alonso *et al.* (2012) a metaplasia escamosa da bexiga é definida como a transformação do urotélio normal em epitélio escamoso estratificado e pode ser ou não queratinizante. A metaplasia escamosa não queratinizante geralmente é observada no trígono da bexiga, enquanto a metaplasia escamosa queratinizante pode ser considerada uma lesão pré-neoplásica onde há a formação excessiva de epitélio escamoso, indentificada por grupos de

células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear, com descamação e acúmulo do epitélio (Ahmad *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2012).

Os resultados dos níveis proteicos de Uroplaquina III (UPIII) obtidos nos diferentes tratamentos corroboram com a histopatologia, pois a perda da expressão de UPIII está associada a parâmetros clínicos de CB agressivo de alto grau e histopatológico (Matsumoto *et al.*, 2008). As Uroplaquinas (UPs) são proteínas transmembranares específicas do urotélio e podem ser consideradas como bons marcadores tumorais específicos para carcinomas de células transicionais (TCC) (Kageyama *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 1999). A UPIII tem demonstrado ser um marcador imuno-histoquímico valioso, altamente específico e sensível aos carcinomas uroteliais, inclusive em pacientes com a doença metastática de local primário desconhecido (Brown & Wilkinson, 2002; Hayashi *et al.*, 2011). Kaufmann *et al.* (2000) observaram a expressão de UPIII em 60% dos carcinomas uroteliais primários, 53% dos carcinomas uroteliais metastáticos e os tumores não-uroteliais estudados foram negativos para UPIII.

O grupo Câncer apresentou o maior nível proteico de NOX4, ou seja, nos carcinomas uroteliais não invasivos de alto grau, que incluem pTa e pT1. Além disso, o grupo tratado com Salan(Ni) reduziu o nível proteico de NOX4 indicando a diminuição da geração de EROs e supressão do crescimento de células cancerosas. Esses dados indicam que NOX4 pode mediar a geração de EROs contribuindo para a carcinogênese urotelial e a sobrevivência das células cancerígenas, pois as enzimas NADPH oxidase (NOX) e dupla oxidases (DUOX) geram EROs de uma forma regulada, produzindo oxigênio reativo em várias células e tecidos em resposta a fatores de crescimento, citocinas e sinais do cálcio (Lambeth, 2004). Evidências implicam que baixos níveis de EROs gerados pelas enzimas NOX atuem como mediadores de inflamação, apoptose, crescimento celular e angiogênese em diferentes tipos de câncer humano (Shimada *et al.*, 2009). Entre os membros da família NOX, a função de NOX4 é

manter a geração intracelular de EROs tanto em carcinomas de alto como de baixo graus e também em células de carcinoma urotelial superficial e invasivo, contribuindo na etapa inicial da carcinogênese urotelial e na sobrevivência da célula cancerosa (Shimada *et al.*, 2011). EROs também controlam a expressão de vários genes supressores de tumores como p53 e PTEN (Gupta *et al.*, 2012).

O complexo Salan(Ni) ainda indicou melhoras nas funções supressoras de tumor pelos níveis de p53 e PTEN. De acordo com Li *et al.* (2008) p53 e PTEN foram consideradas como unidades antitumorais autônomas que funcionavam de forma independente uma da outra. No entanto, evidências recentes apontam para uma cooperação complexa e em vários níveis entre esses supressores de tumor (Trotman & Pandolfi, 2003). De acordo com Li *et al.* (2008) *Wild Type* p53 (wt-p53) e PTEN podem melhorar cada uma das funções supressoras de tumor. wt-p53 aumenta a transcrição do gene PTEN pela ligação e ativação do promotor de PTEN (Li *et al.*, 2008). A proteína p53 é um fator de transcrição que regula o crescimento celular em resposta a estresses variáveis, e é também um importante fator supressor de tumor (Ferriès *et al.*, 2001). A ativação de p53 suprime a transformação celular, resultado da sua capacidade em ativar a transcrição de uma grande variedade de genes alvo, que por sua vez regulam a interrupção do ciclo celular, a apoptose, o reparo do DNA, a supressão da angiogênese e metástase e a diferenciação em células danificadas (Yang *et al.*, 2013).

Tanaka & Grossman (2003) relatam que a introdução de PTEN em células deficientes desse gene inibe a ativação de Akt, uma quinase serina/treonina. Akt está envolvida em uma variedade de vias proliferativas e antiapoptóticas que são dependentes da sinalização PI3K para a ativação. Esses mesmos autores citam que PTEN inibe o crescimento de células de CB humano *in vitro* e restaura a quimiossensibilidade a uma sublinhagem de células de CB humana resistente a doxorrubicina.

Além de fatores supressores de tumores, numerosos fatores angiogênicos têm sido descritos, sendo que os resultados obtidos sugerem que Salan(Ni) controla angiogênese diminuindo os níveis de VEGF que é o principal fator angiogênico. VEGF desempenha um papel fundamental no processo de angiogênese (condição prévia, necessária para o crescimento tumoral e metástases), pois promove a angiogênese, estimulando a proliferação capilar, migração e permeabilidade (Crew *et al.*, 1997; Crew *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2004; O'Brien *et al.*, 1995). Salan(Ni) também aumentou os níveis de endostatina, um potente inibidor direto endógeno da angiogênese. Entre os inibidores endógenos da angiogênese no organismo, a endostatina possui o mais largo espectro antitumoral, representando um modelo que no futuro pode ser um agente antitumoral para a coadministração com outras terapias (Folkman *et al.*, 2006).

Em conclusão, destaca-se algumas limitações deste trabalho como a fraca estabilidade dos complexos tipo Salan em soluções. Porém, foi possível avaliar as primeiras respostas do CB aos tratamentos utilizando esses complexos. Finalmente, esse trabalho propõe uma busca por veículos que melhorem a estabilidade dos complexos Salan(Ni) e Salan(Pt) em soluções e aumente a eficácia para o tratamento do CB.

Referências

ABDULGHANI, A. J.; ABBAS, N. M. Synthesis Characterization and Biological Activity Study of New Schiff and Mannich Bases and Some Metal Complexes Derived from Isatin and Dithiooxamide. *Bioinorg Chem Appl.*; v. 2011, pp.1-15, 2011.

AHMAD, I.; BARNETSON, R. J.; KRISHNA, N. S. Keratinizing Squamous Metaplasia of the Bladder: A Review. *Urol. Int.*;v.81, pp.247–251, 2008.

ALONSO, F. V.; CAMPOS, R. B.; SANZ, I. P.; SÁNCHEZ, M. S.; HERNANDEZ, J. M. M.; MARTIN, J. F. F.; OLMO, J. M. C. Conservative Management of Unusual Keratinising Squamous Metaplasia of the Bladder in a 28-Year-Old Female and Overview of the Literature. *Case Rep Urol.*; v.2012, pp.1-3, 2012.

BAUL, T. S. B.; BASU, S.; DE VOS, D.; LINDEN, A. Amino acetate functionalized Schiff base organotin (IV) complexes as anticancer drugs: synthesis, structural characterization, and in vitro cytotoxicity studies. *Invest. New Drugs*; v.27, pp.419-431, 2009.

BHÖLE, A. & BRANDAU, S. Imune mechanisms in *Bacillus Calmette Guerin* Immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*; v.170, pp.964-969, 2003.

BROWN, H. M.; WILKINSON, E. J. Uroplakin-III to Distinguish Primary Vulvar Paget Disease From Paget Disease Secondary to Urothelial Carcinoma. *Hum. Pathol.*; v.33, 545-548, 2002.

CHANG, H-Q.; JIA, L.; XU, J.; ZHU, T.-F.; XU, Z.-Q.; CHEN, R-H.; MA, T.-L.; WANG, Y.; WU, W.-N. Syntheses, crystal structures, anticancer activities of three reduce Schiff base ligand based transition metal complexes. *J. Mol. Struct.*; v.1106, pp.366-372, 2016.

COMPÉRAT, E. & KWAST, T. H. V. D. Pathological staging of bladder cancer. *Diagn. Histopathol.*; v.19, pp.366-375, 2013.

CREW, J. P.; O'BRIEN, T.; BRADBURN, M.; FUGGLE, S.; BICKNELL, R.; CRANSTON, D.; HARRIS, A. L. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Relapse and Stage Progression in Superficial Bladder Cancer. *Cancer Research*; v.57, pp.5281-5285, 1997.

CREW, J. P.; O'BRIEN, T.; BICKNELL, R.; FUGGLE, S.; CRANSTON, D.; HARRIS, A. L. Urinary Vascular Endothelial Growth Factor and its Correlation with Bladder Cancer Recurrence Rates. *J. Urol.*; v.161, pp.799-804, 1999.

DOGAN, A.; BASAK, N.; DEMIRCI, S.; TELCI, D.; DEDE, B.; TUZCU, M.; OZERCAN, I. H.; SAHIN, K.; SAHIN, F. A Novel Schiff Base Derivative for Effective Treatment of Azoxymethane Induced Colon Cancer. *IJPSR*, v.5, pp.3544-3550, 2014.

EPSTEIN, J. L.; AMIN, M. B.; REUTER, V. R. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am. J. Surg. Pathol.*; v.22, pp.1435-1448, 1998.

FÁVARO, W. J.; NUNES, O. S.; SEIVA, F. R.; NUNES, I. S.; WOOLHISER, L. K.; DURÁN, N.; LENAERTS, A. J. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infect. Agent. Cancer.*; v.7, p.1-14, 2012.

FERRIÈS, E.; CONNAN, F.; PAGÈS, F.; GASTON, J.; HAGNÉRÉ, A.-M.; VIEILLEFOND, A.; THIOUNN, N.; GUILLET, J.-G.; CHOPPIN, J. Identification of p53 Peptides Recognized by CD8⁺ T Lymphocytes From Patients With Bladder Cancer. *Hum. Immunol.*; v.62, pp.791-798, 2001.

FILOMENI, G.; CERCHIARO, G.; FERREIRA, A. M. C.; MARTINO, A.; PEDERSEN, J. Z.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Pro-apoptotic Activity of Novel Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes Depends on Oxidative Stress Induction and Organelle-selective Damage. *J. Biol. Chem.*; v.282, pp.12010-12021, 2007.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell. Res.*; v.312, pp.594-607, 2006.

GARCIA, P. V.; SEIVA, F. R. F.; CARNIATO, A. P.; JÚNIOR, W. M.; DURAN, N.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, A. G.; ROMIH, R.; NUNES, I. S.; NUNES, O. S.; FÁVARO,

W. J. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*; v.16, pp.1-18, 2016.

GLAS, A. S.; ROOS, D.; DEUTEKOM, M.; ZWINDERMAN, A. H.; BOSSUYT, P. M. M.; KURTH, K. H. Tumor Markers in the Diagnosis of Primary Bladder Cancer. A Systematic Review. *J. Urol.*; v. 169, pp.1975-1982, 2003.

GUPTA, S. C.; HEVIA, D.; PATCHVA, S.; PARK, B.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid. Redox Signal.*; v.16, pp.1295-1322, 2012.

HAJREZAIE, M.; SHAMS, K.; MOGHADAMTOUSI, S. Z.; KARIMIAN, H.; HASSANDARVISH, P.; EMTYAZJOO, M.; ZAHEDIFARD, M.; MAJID, N. A.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A. Chemoprevention of Colonic Aberrant Crypt Foci by Novel Schiff Based Dichlorido(4-Methoxy-2-{[2-(Piperazin-4-ylmethyl)ethyl]iminomethyl}Phenolate) Cd Complex in Azoxymethane-Induced Colorectal Cancer in Rats. *Sci Rep.*; v.5, pp.1-15, 2015.

HAYASHI, T.; SENTANI, K.; OUE, N.; ANAMI, K.; SAKAMOTO, N.; OHARA, S.; TEISHIMA, J.; NOGUCHI, T.; NAKAYAMA, H.; TANIYAMA, K.; MATSUBARA, A.; YASUI, W. Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology*; v.59, pp.710–721, 2011.

HELAL, M.; AL-DOUH, M.; HAMID, S.; OSMAN, H.; SALHIMI, S.; MAJID, A. M. S. A. Diaminobenzene Schiff Base Induces Caspase 9-dependent Apoptosis In U937 Leukemia Cells. *WebmedCentral*; v.1, pp.1-13, 2010.

KAGEYAMA, S.; YOSHIKI, T.; ISONO, T.; TANAKA, T.; KIM, C. J.; YUASA, T.; OKADA, Y. High Expression of Human Uroplakin Ia in Urinary Bladder Transitional Cell Carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*; v.93, pp.523–531, 2002.

KASSOUF, W.; TRABOULSI, S. L.; SCHMITZ-DRÄGER, B.; PALOU, J.; WITJES, J. A.; RHIJN, B. W.G. V.; GROSSMAN, H. B.; KIEMENEY, L. A.; GOEBELL, P. J.; KAMAT, A. M. Follow-up in non–muscle-invasive bladder cancer – International Bladder Cancer Network recommendations. *Urol. Oncol.*; v.34, pp.460-468, 2016.

KAUFMAN, D. S.; SHIPLEY, W. U.; FELDMAN, A. S. Bladder cancer. *Lancet*; v.374,239-249, 2009.

KAUFMANN, O.; VOLMERIG, J.; DIETEL, M. Uroplakin III Is a Highly Specific and Moderately Sensitive Immunohistochemical Marker for Primary and Metastatic Urothelial Carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*; v.113, pp.683-687, 2000.

KOBAYASHI, S.; NOJIMA, Y.; SHIBUYA, M.; MARU, Y. Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*; v.300, pp.455–462, 2004.

LAMBETH, J. D. NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nature Immunol.*; v.4, pp.181-189, 2004.

LAMM, D. L.; STOGDILL, V. D.; STOGDILL, B. J.; CRISPEN, R. G. Complications of *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J. Urol.*; v.135, pp.272-274, 1986.

LI, Y.; GUESSOUS, F.; KWON, S.; KUMAR, M.; IBIDAPO, O.; FULLER, L.; JOHNSON, E.; LAL, B.; HUSSAINI, I.; BAO, Y.; LATERRA, J.; SCHIFF, D.; ABOUNADER, R. PTEN

Has Tumor-Promoting Properties in the Setting of Gain-of-Function p53 Mutations. *Cancer Res.*; v.68, pp.1723-1731, 2008.

MATSUMOTO, K.; SATOH, T.; IRIE, A.; ISHII, J.; KUWAO, S.; IWAMURA, M.; BABA, S. Loss Expression of Uroplakin III is Associated with Clinicopathologic Features of Aggressive Bladder Cancer. *Urology*; v.72, pp.444-449, 2008.

O'BRIEN, T.; CRANSTON, D.; FUGGLE, S.; BICKNELL, R.; HARRIS, A.L. Different Angiogenic Pathways Characterize Superficial and Invasive Bladder Cancer. *Cancer Research*; v.55, pp.510-513, 1995

QIAO, X.; MA, Z.-Y.; XIE, C.-Z.; XUE, F.; ZHANG, Y.-W.; XU, J.-Y.; QIANG, Z.-Y.; LOU, J.-S.; CHEN, G.-J.; YAN, S.-P. Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *J. Inorg. Biochem.*; v.105, pp.728–737, 2011.

RAMA, I.; SELVAMEENA, R. Synthesis, structure analysis, anti-bacterial and in vitro anti-cancer activity of new Schiff base and its copper complex derived from sulfamethoxazole. *J. Chem. Sci.*; v.127, pp. 671-678, 2015.

REIS, L.O.; PEREIRA, T.C.; FAVARO, W.J.; CAGNON, V.H.; LOPES-CENDES, I.; FERREIRA, U. Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. *World J. Urol.*; v.27, pp.353-361, 2009.

RUIZ, J.; RODRÍGUEZ, V.; CUTILLAS, N.; ESPINOSA, A.; HANNON, M. J. Novel C,N-chelate platinum(II) antitumor complexes bearing a lipophilic ethisterone pendant. *J. Inorg. Biochem.*; v.105, pp.525–531, 2011.

SALMOND, J. M. Pathology of tumours of the kidney and urinary tract. *Surgery*; v.34, pp.487-492, 2016.

SCHENK-BRAAT, E. A. M.; BANGMA, C. H. Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*; v54, pp.414-423, 2005.

SHIMADA, K.; FUJII, T.; ANAI, S.; FUJIMOTO, K.; KONISHI, N. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BMC Urol.*; v.11, pp.22, 2011.

SHIMADA, K.; NAKAMURA, M.; ANAI, S.; VELASCO, M.D.; TANAKA, M.; TSUJIKAWA, K.; OUJI, Y.; KONISHI, N. A Novel Human AlkB Homologue, ALKBH8, Contributes to Human Bladder Cancer Progression. *Cancer. Res.*; v.69, pp.3157- 3164, 2009.

SUTTMANN, H.; RIEMENSBERGER, J.; BENTIEN, G.; SCHMALTZ, D.; STÖCKLE, M.; JOCHAM, D.; BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Neutrophil Granulocytes are Required for Effective *Bacillus Calmette-Guerin* Immunotherapy of Bladder Cancer and Orchestrate Local Immune Responses. *Cancer Res.*; v. 66, pp. 8250–8257, 2006.

SYLVESTER, R. J.; VAN DER MEIJDEN, A. P.; LAMM, D. L. Intravesical *Bacillus Calmette-Guerin* reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.*; v.168, pp.1964-1970, 2002.

TABASSUM, S.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. New heterobimetallic $\text{Cu}^{\text{II}}\text{—Sn}^{\text{IV}}_2$ complex as potential topoisomerase I inhibitor: *In vitro* DNA binding, cleavage and cytotoxicity against human cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.*; v.115, 63-72, 2012.

TANAKA, M.; GROSSMAN, H. B. *In vivo* gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth, downregulates phosphorylated Akt, and increases sensitivity to doxorubicin. *Gene Therapy*; v.10, pp.1636–1642, 2003.

TROTMAN, L. C.; PANDOLFI, P. P. PTEN and p53: who will get the upper hand? *Cancer Cell*; v.3, pp.97–99, 2003.

XIAO, Y.; BI, C.; FAN, Y.; CUI, C.; ZHANG, X.; DOU, Q. P. L-glutamine Schiff base copper complex as a proteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cancer cells. *Int. J. Oncol.*; v.33, pp.1073-1079, 2008.

YANG, Z.; NIE, S.; ZHU, H.; WU, X.; JIA, S.; LUO, Y.; TANG, W. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with bladder cancer: A meta-analysis. *Gene*; v.512, 408–413, 2013.

YUASA, T.; YOSHIKI, T.; ISONO, T.; TANAKA, T.; HAYASHIDA, H.; OKADA, Y. Expression of transitional cell-specific genes, uroplakin Ia and II, in bladder cancer: Detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of metastatic patients. *Int. J. Urol*; v.6, pp.286–292, 1999.

ZHANG, N.; FAN, Y.; ZHANG, Z.; ZUO, J.; ZHANG, P.; WANG, Q.; LIU, S. Syntheses, crystal structures and anticancer activities of three novel transition metal complexes with Schiff base derived from 2-acetylpyridine and l-tryptophan. *Inorg. Chem. Commun.*; v.22, pp. 68-72, 2012.

ZHANG, X.; BI, C.; FAN, Y.; CUI, Q.; CHEN, D.; XIAO, Y.; DOU, Q. P. Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff base copper complex is associated with the inhibition of proteasomal activity. *Int. J. Mol. Med.*; v.22, pp.677-682, 2008.

4.3. Capítulo III: Novas Terapias Baseadas em Complexos Tipo Salan Lipofílicos e Carreador Lipídico Nanoestruturado para o Tratamento do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

Mirian Y. Matsumoto¹; Joel G. de Souza¹; Petra K. Böckelmann¹; Eduardo A. R. Socca¹; Andrelson W. Rinaldi²; Nelson Durán³; Wagner J. Fávaro^{1*}

¹ **Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.**

² **Laboratório de Química de Materiais e Sensores, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.**

³ **NanoBioss/BiolChemLab, Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil.**

Apoio financeiro: FAPESP, processo nº 2013/04708-8.

*Autor correspondente: Wagner J. Fávaro - Ph.D., Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Telefone / fax: +55 19 3521 6104; e-mail: wjfavaro@gmail.com

Resumo

O câncer de bexiga (CB) está entre os tumores malignos mais comuns em todo mundo. A maioria (mais de 70%) dos CBs são primeiramente diagnosticados como não-músculo invasivos (CBNMI) nos estádios Ta, T1, e carcinoma *in situ* (CIS). Atualmente, o tratamento mais utilizado para o CBNMI envolve a imunoterapia com BCG (Bacillus Calmette-Guérin) associado à ressecção transuretral. No entanto, a utilização de BCG pode causar graves efeitos colaterais e está associada a uma elevada taxa de recorrência após o tratamento. Por conseguinte, várias abordagens têm sido investigadas, incluindo o desenvolvimento de novas moléculas, assim como a melhoria da terapia com medicamentos convencionalmente utilizados no tratamento de cânceres e a incorporação de sistemas de carreamento de fármacos. Considerando o uso de novas moléculas, complexos metálicos derivados de bases de Schiff (BSs) são compostos versáteis com atividade antitumoral, oferecendo novas perspectivas para a terapia do CBNMI. Em relação ao carreamento de fármacos, ao longo dos últimos anos, carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) têm atraído considerável interesse como veículos alternativos para produtos farmacêuticos anticancerígenos. Portanto, este trabalho visa testar os efeitos dos complexos de níquel [Salan(Ni)] e platina [Salan(Pt)] lipofílicos derivados da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan), assim como o complexo Salan(Pt) incorporado no carreador lipídico nanoestruturado [Salan(Pt)-CLN] e avaliar o efeito antitumoral desses compostos no tratamento do CBNMI. Nos resultados obtidos, o protocolo de indução do câncer utilizando MNU foi efetivo, desenvolvendo tumor indiferenciado, diagnosticados como carcinoma papilífero (pTa) e carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1) associado a metaplasia escamosa. Os grupos tratados com Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN apresentaram uma melhor recuperação histopatológica em relação ao grupo BCG, sendo que o grupo Salan(Ni) apresentou os melhores resultados em relação a redução da agressividade do CB. As análises de *Western blotting* (WB) indicaram que os tratamentos

com Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN ativam a via p53 através da diminuição dos níveis proteicos de Akt e PI3K. Esses resultados permitiram selecionar Salan(Ni) como tratamento mais eficaz e promissor para futuros estudos biológicos adicionais.

Palavras-chave: Câncer de bexiga, Complexos lipofílicos, Carreador lipídico nanoestruturado.

1. Introdução

O Câncer de bexiga (CB) é um tipo de câncer comum em todo o mundo, cuja incidência continua a aumentar (Maase *et al.*, 2000). A maioria desses cânceres são carcinomas uroteliais, tumores superficiais e acomete principalmente a população idosa (Rhijn *et al.*, 2009). Os tumores superficiais, ou seja, os cânceres de bexiga não-musculo invasivos (CBNMI) representam mais de 70% dos casos de CB e podem ser classificados em 3 estádios: pTis (carcinoma plano *in situ*), pTa (carcinoma papilar não invasivo) e pT1 (tumor invade a submucosa da parede da bexiga) (Garcia *et al.*, 2016).

Os tumores superficiais são tratados efetivamente com ressecção transuretral (RTU) e terapia intravesical (Grossman *et al.*, 2003). Os agentes utilizados para terapia intravesical são os imunomoduladores Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e interferon α -2b, e agentes quimioterapêuticos tais como mitomicina C, doxorubicina, tiotepa e gencitabina (Kaufman *et al.*, 2009). Apesar de existirem algumas alternativas para o tratamento do CBNMI, a imunoterapia com BCG ainda é superior à quimioterapia intravesical para a redução de recorrências do CB e constitui na única forma de tratamento para prevenir e/ou atrasar a progressão do CB para a forma da doença músculo invasiva (CBMI) (Brandau & Suttman, 2007).

No entanto, a administração intravesical de fármacos apresenta algumas limitações, como a baixa permeabilidade do urotélio, o que pode representar um obstáculo à eficácia desses fármacos, assim como a micção periódica da urina que elimina essas soluções de fármacos instiladas na bexiga reduzindo o tempo de retenção do tratamento na bexiga (GuhaSarkar & Banerjee, 2010; Martin *et al.*, 2013). Pesquisas recentes sugerem que o uso da nanotecnologia na terapia intravesical pode aumentar a permanência do fármaco na bexiga, assim como melhorar a permeabilidade dos mesmos nos tumores de bexiga (Hsu & King,

2012). Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) têm despertado considerável interesse como veículos alternativos para produtos farmacêuticos anticancerígenos (Chen *et al.*, 2015). CLNs são capazes de encapsular diferentes fármacos (lipofílicos e hidrofílicos) e podem ser instilados pela via intravesical (Üner & Yener, 2007; Mehnert & Mäder, 2012).

Na classe de compostos lipofílicos, Inba *et al.* (2013) relatam que as bases de Schiff (BSs) apresentam propriedades lipofílicas versáteis. As BSs são fármacos antineoplásicos potenciais e, quando administrados como complexos metálicos, a atividade antitumoral desses complexos aumenta em comparação com o ligante livre (Majumder *et al.*, 2006). Essas bases são facilmente preparadas pela reação de condensação de dois compostos, sendo um aldeído e uma amina primária (Correia *et al.*, 2005; Majumder *et al.*, 2006). Os compostos do tipo BS são utilizados como materiais de partida na síntese de fármacos antitumorais (Inba *et al.*, 2013). Contudo, os complexos metálicos derivados de BSs não são normalmente adequados para serem administrados como pró-fármacos devido à sua elevada labilidade em soluções aquosas (Enyedy *et al.*, 2011; Lloret *et al.*, 1991; Simplício *et al.*, 2008). Chaviara *et al.* (2005) foram os pioneiros a testar a atividade antitumoral de complexos de cobre derivados de uma BS sintetizada *in vivo* e solubilizar as doses administradas em DMSO (10%) com posterior diluição em óleo de milho (90%). Os resultados obtidos por Chaviara *et al.* (2005) permitiram a seleção de um complexo de cobre que apresentou baixa toxicidade e atividade antitumoral comparativamente alta em relação aos outros complexos testados. Nessa linha de pesquisa, este trabalho tem por objetivo testar os complexos sintetizados *N*-Salicilideno anilina(níquel) [Salan(Ni)] e *N*-Salicilideno anilina(platina) [Salan(Pt)] lipofílicos derivados da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan) e incorporar o complexo Salan(Pt) em um CLN para avaliar seus efeitos na progressão do CBNMI.

2. Materiais e métodos

2.1. Síntese dos complexos derivados da base de Schiff *N*-Salicilideno anilina

Para a síntese da BS *N*-Salicilideno anilina (Salan), salicilaldeído foi utilizado para reagir com anilina. A BS Salan foi utilizada como composto partida nas sínteses dos complexos *N*-Salicilideno anilina(níquel) [Salan(Ni)] e *N*-Salicilideno anilina(platina) [Salan(Pt)]. Os procedimentos de síntese da BS Salan e correspondentes complexos estão descritos no Capítulo I.

2.2. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs)

Os CLNs foram preparados por fusão-emulsificação a partir da matriz lipídica sólida composta de murumuru e Bis-diglyceryl polyacyladipate-2 (Figura 1a), que foram aquecidos até aproximadamente 32°C. Paralelamente, uma fase aquosa contendo o surfactante Pluronic® F-68 (poloxâmero tribloco de natureza não iônica) foi aquecida à no máximo 40°C e agitada até sua completa solubilização (Figuras 1b e 1c). Para aumentar a estabilidade da emulsão foi adicionado óleo de buriti a matriz lipídica (Figura 1d) e posteriormente incorporou-se o princípio ativo, o complexo Salan(Pt) (síntese descrita no Capítulo I), por dissolução (Figura 1e). Em seguida, essa fase foi emulsificada na fase aquosa através da pré-dispersão em um sistema de agitação mecânica (homogenizador Ultraturrax® IKA® T18) a uma velocidade de agitação de 14000 rpm durante 40 minutos. (Figura 1f), obtendo-se assim o CLN contendo o complexo Salan-Pt [Salan(Pt)-CLN] (Figura 1g). A razão de lipídio para fase aquosa utilizada foi de 1:20.

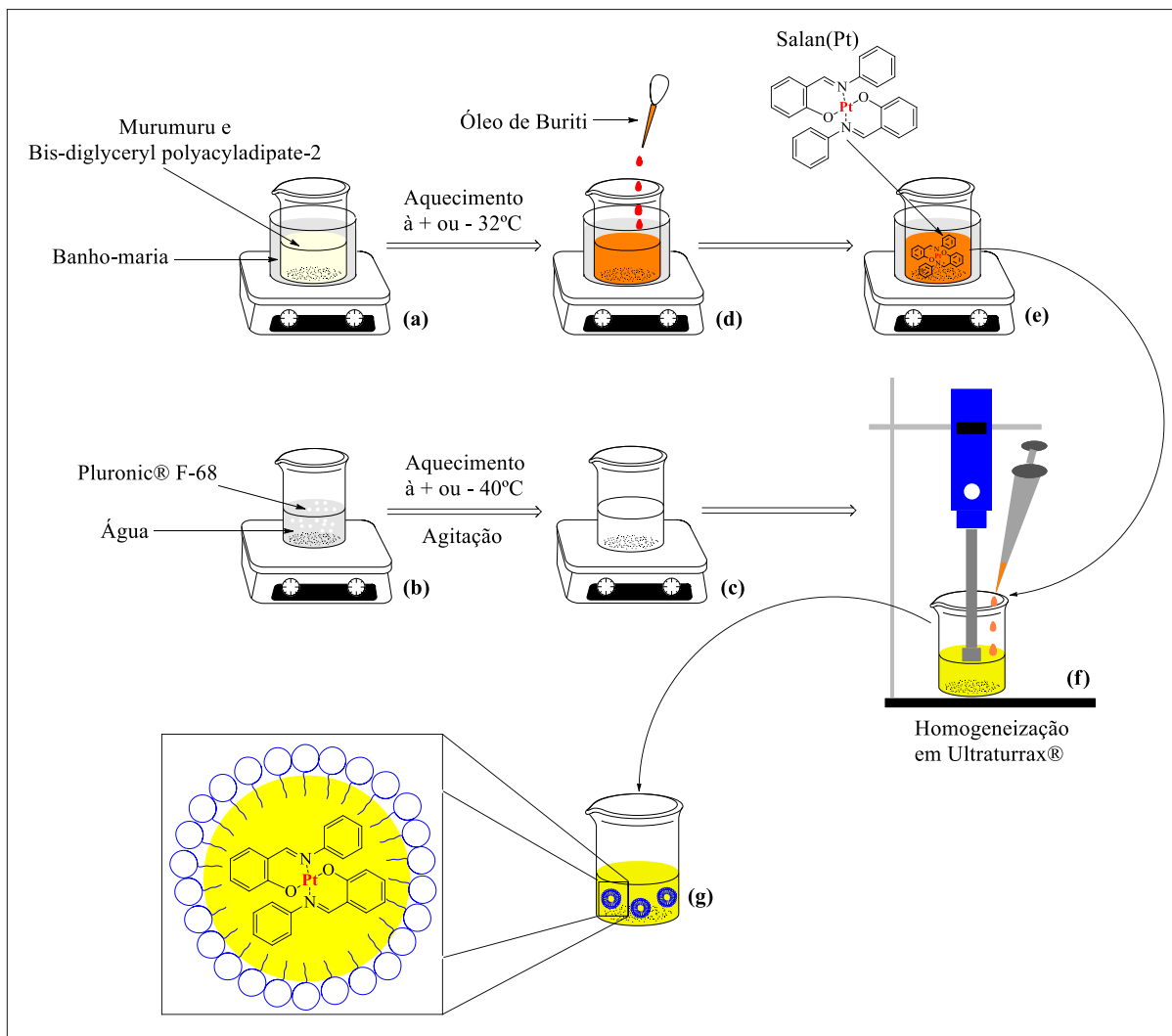


Figura 1: Representação esquemática do processo de obtenção do Salan(Pt)-CLN pelo método de homogeneização em alta velocidade.

Adicionalmente, foi preparado um sistema nanoparticulado (CLN) sem a adição do complexo Salan(Pt).

2.3. Caracterização dos CLNs preparados

2.3.1. Tamanho de partícula, distribuição e potencial zeta

As medidas de tamanho das partículas e índice de polidispersividade (PDI) das formulações de CLNs foram realizadas por espectroscopia de correlação de fótons baseando-se no princípio do espalhamento dinâmico de luz (DLS). O potencial zeta das formulações de CLNs desenvolvidos foi determinado por análise da mobilidade elétrica das nanopartículas. Ambas as medidas foram realizadas a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25°C, utilizando o analisador de partícula Malvern ZetaSizer-Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Para isso, as amostras foram diluídas 20 vezes em água ultrapura e transferidas para uma cubeta de acrílico. Os resultados foram obtidos através da média de 15 determinações em cada uma das leituras que foram realizadas em triplicatas. A estabilidade física das nanosuspensões foi observada através de medidas de tamanho, PDI e potencial zeta decorridos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias do processo de preparação das partículas (período de tratamento dos animais).

O tamanho das partículas também foi determinado pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) utilizando o equipamento NanoSight (LM 20, RU) equipado com software Nanoparticle Tracking (NTA 2.0). As amostras foram dispersas em água desionizada na proporção de 1:10.000.

2.3.2. Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi avaliada através de medidas de absorvância no comprimento de onda de 316 nm utilizando um espectrofotômetro ultravioleta (UV) / visível (VIS) Cary 50 (Varian, Mulgrave, Austrália). Primeiro determinou-se a concentração de Salan(Pt) retida no CLN, em que 400 µL de Salan(Pt)-CLN foi centrifugado em um filtro para

centrífuga (0,5 mL) por 20 minutos a 10.000 rpm, para que as nanopartículas geradas pudessem ser separadas do sobrenadante aquoso. O filtro contendo a fase sólida de Salan(Pt)-CLN foi centrifugado novamente em posição invertida. A fase sólida de Salan(Pt)-CLN foi dissolvida em 2000 µL de metanol. Para determinar a concentração do complexo Salan(Pt) na dispersão total de Salan(Pt)-CLN, 400 µL de Salan(Pt)-CLN foi solubilizado em 1600 µL de metanol. Ambas as soluções foram filtradas (0,45 mm) para obtenção de uma dispersão fina. A curva padrão do método analítico envolveu 5 pontos. Para a construção da curva padrão utilizou-se as seguintes concentrações do complexo Salan(Pt): 50; 37,5; 25; 10 e 5 µg/mL em DMSO. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Para a leitura das absorbâncias utilizou-se como solvente e branco a mistura de DMSO e Metanol (1:1). A EE de Salan(Pt) foi definida como a razão entre a quantidade de Salan(Pt) retida no CLN e a quantidade de Salan(Pt) medida na dispersão total de Salan(Pt)-CLN, como a equação:

$$\% \text{ EE} = \frac{[\text{de Salan(Pt) retido no CLN}]}{[\text{de Salan(Pt) na dispersão total de Salan(Pt)-CLN}]} \times 100$$

2.4. Avaliação in vivo de derivados da base de Schiff Salan na progressão do CBNMI

2.4.1. Protocolo de indução do CBNMI

35 ratas da linhagem Fischer 344, na faixa etária de quatro semanas foram alojadas em gaiolas (2/3 ratas por gaiola) sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo invertido de 12 horas claro/escuro. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB, UNICAMP, Campinas, SP). Todos os animais experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). O

protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 4332-1 - CEUA – Anexo II) do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Foi utilizado um protocolo de indução padronizado por Fávoro *et al.* (2012) de CBNMI utilizando *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) associado com solução de citrato de sódio administrado pela via intravesical (Figura 1A – Anexo III) (Fávoro *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). Para a indução do CB, foram utilizados 30 animais, que foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (10mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (75mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 0,3 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Fávoro *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). Para os procedimentos de indução foi utilizada cabine de segurança classe II A2 (*The Baker Company, Sanford, ME, EUA*). Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram submetidos ao exame de ultrassom, utilizando um sistema de ultrassom portátil controlado por software, com um transdutor 10-5 megahertz 38 milímetros lineares, para avaliar a ocorrência de tumor e posteriormente divididos em 5 grupos (5 animais cada) como descrito na Tabela 1. Os 5 animais que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle**. As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (*Abocath, São Paulo, Brasil*). Após 16 semanas de experimento os animais foram previamente anestesiados, sendo necessário aprofundamento da anestesia, aplicou-se Cloridrato de Xilazina 2% (30mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (225mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA), seguido de eutanásia por punção cardíaca. As bexigas urinárias foram removidas (Figura 1E – Anexo III) e cada uma foi dividida em duas partes: metade para ser submetida a processamento histológico com

posterior análise histopatológica e outra metade apenas congelada para análise protéica por *Western blotting* (WB).

Como anteriormente citado, Chaviara *et al.* (2005) sintetizaram uma nova série de complexos de cobre derivados de BS, estabeleceram suas estruturas e administraram por injeção intraperitoneal para avaliar a atividade antitumoral contra leucemia P388. Essas doses foram dissolvidas em DMSO a 10% e óleo de milho 90%. Os resultados relativos à toxicidade e atividade antitumoral dos compostos investigados foram promissores e permitiram a seleção de um composto piloto para estudos biológicos. Dessa maneira, a lipofilicidade dos complexos sintetizados, assim como suas estabilidades na urina foram testadas, coletando-se urina dos animais com CB e acrescentando-se nas soluções dos complexos em DMSO 2% e óleo de milho 98%. Nas Figuras 2a – 2d observa-se a estabilidade dos Salan(Ni) e Salan(Pt) em soluções oleosas sem a ocorrência de precipitação.

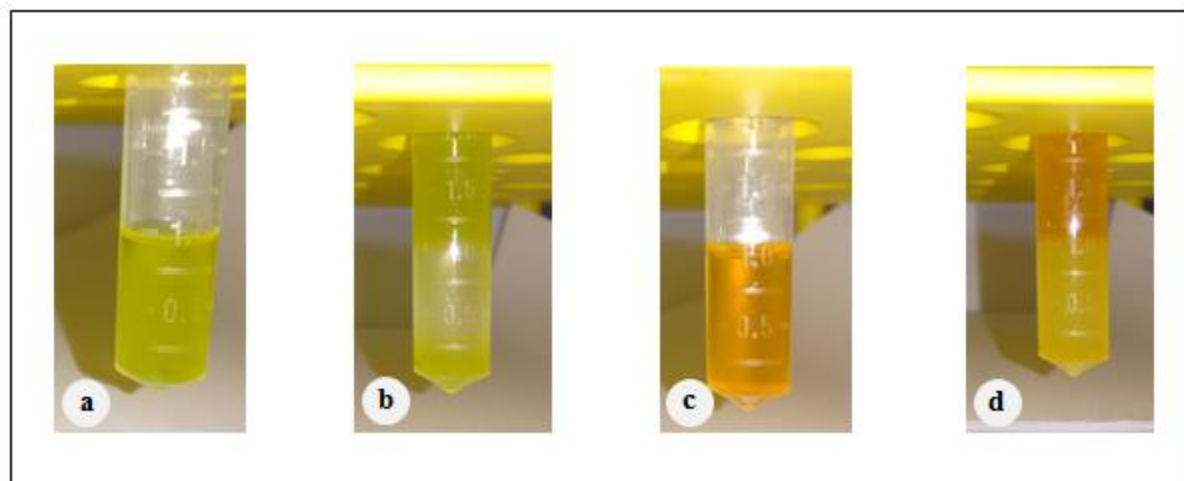


Figura 2: Salan(Ni) solubilizado em DMSO 2% e óleo de milho 98% (a); Salan(Ni) solubilizado em DMSO 2% e óleo de milho 98% e adicionada urina de rato com câncer (b); Salan(Pt) solubilizado em DMSO 2% e óleo de milho 98% (c); Salan(Pt) solubilizado em DMSO 2% e óleo de milho 98% e adicionada urina de rato com câncer (d).

Tabela 1: Desenho experimental para o tratamento do CBNMI induzido por MNU.

Grupos	Tratamento	Período (semanas)
Controle	0,2 mL de DMSO 2% e óleo de milho 98%	6
Câncer	0,2 mL de DMSO 2% e óleo de milho 98%	6
BCG	10 ⁶ UFC / 40 mg de BCG em 0,2 mL de solução fisiológica 0,9%	6
CLN	0,2 mL de carreador lipídico nanoestruturado (CLN)	6
Salan(Ni)	3 mg/kg de Salan(Ni) em 0,2 mL de DMSO 2% e óleo de milho 98%	6
Salan(Pt)	3 mg/kg de Salan(Pt) em 0,2 mL de DMSO 2% e óleo de milho 98%	6
Salan(Pt)-CLN	3 mg/kg de Salan(Pt)-CLN	6

2.4.2. Análise histopatológica

As bexigas urinárias dos animais de cada grupo foram coletadas e fixadas em Bouin por 24 horas. Após essa fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Em seguida, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (*Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA*). Posteriormente, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *Leica RM 2165 (Leica, Munique, Alemanha)* com espessura de 5µm, corados em hematoxilina-eosina (HE). O material obtido foi fotografado no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha)*. Os diferentes grupos experimentais foram classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein *et al.*, 1998).

2.4.3. Determinação dos níveis proteicos das vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (Akt, PI3K e p53) e do balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e Endostatina)

As bexigas urinárias de 5 animais de cada grupo experimental foram coletadas, congeladas, as proteínas extraídas e, posteriormente, submetidas às análises de WB. As bexigas urinárias foram homogeneizadas em tampão de extração contendo: Triton-x-1%; NaCl 150mM; Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; Hepes 1mM, pH 7,6; PMSF 0,2 mM e 10 µL/mL de coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*). Os extratos das bexigas urinárias foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o micrométodo de *Bradford*. O correspondente a 30 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido

eletricamente para membranas de nitrocelulose (GE Helthcare, Alemanha). As membranas foram bloqueadas com Rapid Block 10% diluído em água por 5 minutos e incubadas *overnight* com os anticorpos primários: monoclonal *mouse* sc-5298 (*Santa Cruz Biotechnology, EUA*) para Akt, policlonal *rabbit* sc-67306 (*Santa Cruz Biotechnology, EUA*) para PI3K, monoclonal *mouse* GTX70218 (*GeneTex, EUA*) para p53, monoclonal *mouse* ab1316 (*abcam, EUA*) para VEGFA, monoclonal *mouse* millipore col 18A1 (*Merck Millipore, EUA*) para endostatina e monoclonal *mouse* sigma A1978 (*Sigma-Aldrich, EUA*) para β -actina. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *Anti-rabbit* e *Anti-mouse* HRP conjugados diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *NIH ImageJ 1.47v* (*National Institute of Health, EUA*. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.4.4. Análises estatísticas

Os parâmetros quantificados (análises de WB) foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados o *Test-T* e a análise de variância (*one-way* ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc* para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 1% a 5%. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises histopatológicas foram avaliadas através do teste de proporção Qui-Quadrado. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Caracterização dos CLNs preparados

3.1.1. Tamanho de partícula, distribuição e potencial zeta

Dados referentes ao diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos CLNs obtidos estão descritos na Tabela 2. Os resultados de tamanho indicaram que o CLN livre foi obtido com um tamanho médio de 119,15 nm e o Salan(Pt)-CLN com tamanho médio de 165,4 nm indicando formação das nanopartículas. Pode-se atribuir o maior tamanho de Salan(Pt)-CLN em relação ao CLN livre à incorporação do complexo e, ambas as partículas apresentaram estabilidade de tamanho desde o preparo até decorridos 35 dias.

Coerente com os resultados de tamanho de partícula, os índices de polidispersão médios foram de 0,316 no CLN livre e 0,315 no CLN carregado com Salan(Pt). Nidhin *et al.* (2008) relatam que as amostras que apresentam distribuição de tamanho muito ampla possuem valores de índice de polidispersão $> 0,7$. Baixos índices de polidispersão indicam uma distribuição de tamanho homogênea (Fonseca *et al.*, 2002).

Verificou-se que os CLNs preparados apresentaram carga negativa, com valores médios de potencial do CLN livre de -33,5 mV, enquanto o potencial zeta médio de Salan(Pt)-CLN foi de -34,4 mV, o que indica estabilidade física. De acordo com Riddick (1968) um potencial zeta excelente maior que -30 mV confere uma boa estabilidade física.

Tabela 2: Caracterização físico-química de CLN e Salan(Pt)-CLN.

Nanopartícula	Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mv)
CLN	119,15 ± 3,95	0,316 ± 0,05	-33,5 (±5,8)
Salan(Pt)-CLN	165,4 ± 33,7	0,315 ± 0,053	-34,4 (±4,6)

A análise de NTA confirmou a formação de partículas esféricas, com tamanhos de aproximadamente 127.5nm (±1.1) do CLN livre e 126.8nm (±1.3) do Salan(Pt)-CLN. Foram observadas diferenças de tamanho nos resultados obtidos pelas análises de NTA em relação aos observadas pela técnica espalhamento dinâmico de luz (DLS). De acordo com Souza *et al.* (2015) essa diferença pode ser atribuída ao fato de NTA analisar o movimento browniano de partículas de acordo com a análise de imagem e o movimento dessas partículas estar relacionado a um certo tamanho. Ainda de acordo com Souza *et al.* (2015) na técnica de DLS, que também é baseada em medidas de movimento browniano, não é possível visualizar as partículas e a determinação de tamanho é realizada de acordo com a variação da intensidade da luz dispersa por essas partículas.

3.1.2. Eficiência de encapsulação

Verificou-se que a eficiência de encapsulação foi de 89%. Foi observada uma alta eficiência encapsulação o que indica a afinidade do complexo Salan(Pt) pelo CLN. Esses resultados revelaram que o uso das concentrações de lipídios e surfactante foram adequadas para obtenção de uma elevada eficiência de encapsulação.

3.2. Efeitos de derivados da base de Schiff Salan sobre a progressão do CBNMI

3.2.1. Análise das bexigas urinárias por ultrassom

Para verificar a ocorrência de tumor na bexiga, após indução de CBNMI utilizando MNU foram realizadas análises de ultrassom e as imagens estão representadas na Figura 3. As ultrassonografias das bexigas urinárias dos animais quimicamente induzidos apresentaram massas infiltrando as paredes dorsal e cranial da bexiga (Figuras 3a-f).

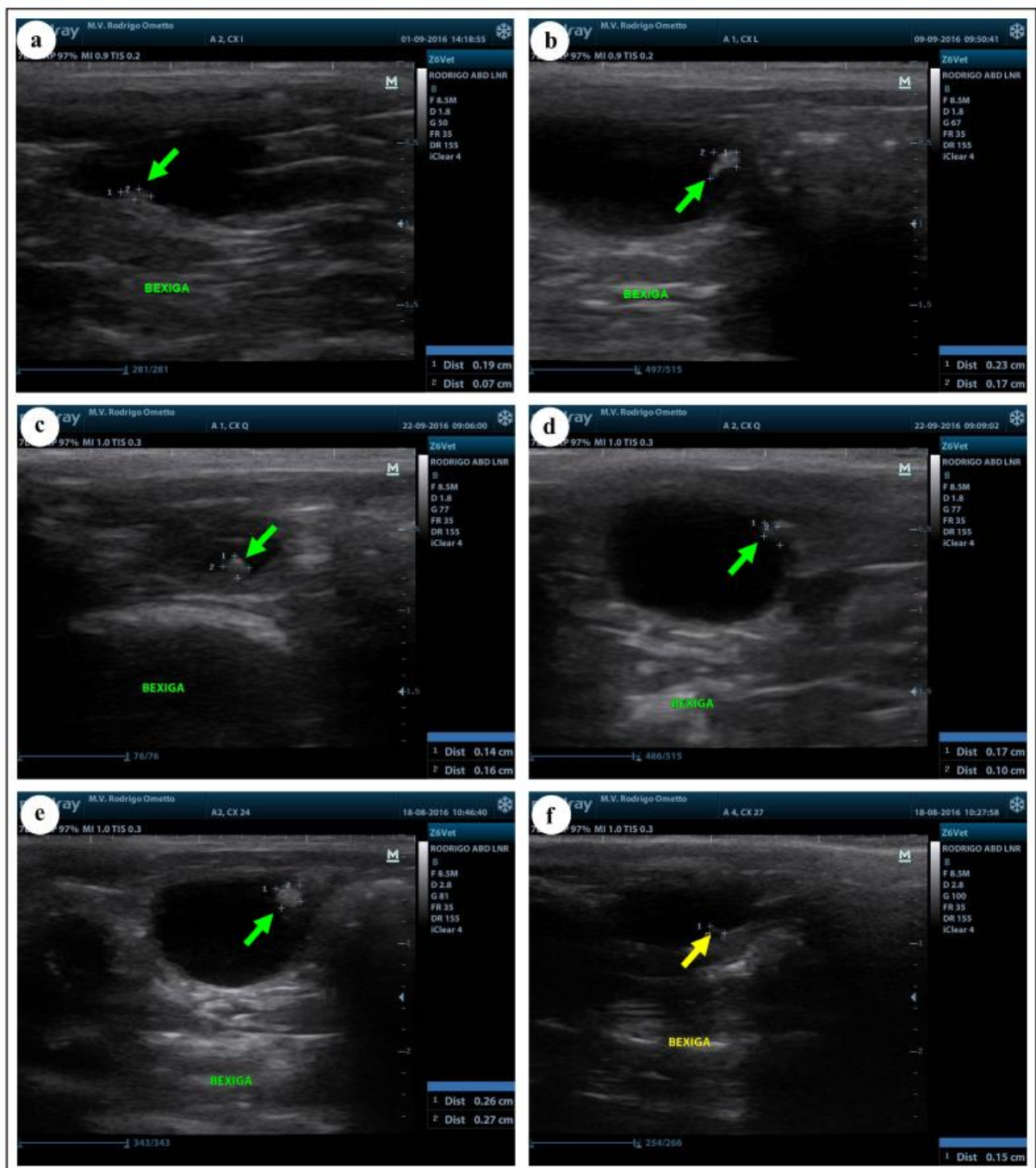


Figura 3: Ultrassonografias representativas dos animais quimicamente induzidos (*setas*): lesão na parede dorsal da bexiga (0,19 x 0,07 cm) (a); lesão na parede cranial da bexiga (0,23 x 0,17 cm) (b); lesão na parede dorsal da bexiga (0,14 x 0,16 cm) (c); lesão na parede cranial da bexiga (0,17 x 0,1 cm) (d); lesão na parede cranial da bexiga (0,26 x 0,27 cm) (e); lesão na parede dorsal da bexiga (0,15 cm) (f).

Os 30 animais que receberam MNU foram então divididos em seis grupos (com cinco animais por grupo) e posteriormente tratados conforme descrito na Tabela 1.

3.2.2. Análise histopatológica

Na Tabela 3 estão descritos os diagnósticos das alterações histopatológicas nas bexigas urinárias dos animais dos grupos Controle, Câncer, BCG, CLN, Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN.

Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas nas bexigas urinárias dos animais dos grupos Controle, Câncer, BCG, CLN, Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN.

<i>Histopatologia</i>	Grupos							Lesão
	Controle	Câncer	BCG	CLN	Salan(Ni)	Salan(Pt)	Salan(Pt)-CLN	
<i>Normal</i>	05 (100%)	-	-	-	01 (20%)	-	-	-
<i>Hiperplasia Plana</i>	-	-	-	-	01 (20%)	01 (20%)	01 (20%)	Benigna
<i>Hiperplasia Papilífera</i>	-	-	-	-	-	-	01 (20%)	Benigna
<i>Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau</i>	-	-	-	-	01 (20%)	-	01 (20%)	Pré-maligna
<i>Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma in situ (pTis)</i>	-	-	01 (20%)	03 (60%)	-	-	-	Maligna
<i>Carcinoma Papilífero de baixo grau (pTa)</i>	-	01 (20%)	01 (20%)	02 (40%)	-	02 (40%)	01 (20%)	Maligna
<i>Carcinoma Papilífero de alto grau (pTa)</i>	-	-	-	-	-	01 (20%)	-	Maligna
<i>Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)</i>	-	04 (80%)	03 (60%)	-	02 (40%)	01 (20%)	01 (20%)	Maligna

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 os animais do grupo Controle apresentaram urotélio normal, composto por três tipos de células, sendo que as células superficiais diferiram em grande parte das células intermediárias e basais subjacentes pela sua forma e tamanho (Figuras 4a e 4b). O grupo Controle foi comparado ao grupo Câncer (Figuras 4c e 4d) e as lesões observadas foram a presença de carcinoma urotelial com invasão

da lâmina própria (pT1) e carcinoma papilífero de baixo grau (pTa) foram observados na bexiga urinária em 80% e 20% dos animais tratados quimicamente induzidos e tratados com DMSO 2% em óleo de milho 98%, respectivamente. O grupo tratado com BCG (Figuras 4e e 4f) apresentou carcinomas classificados como pT1 em 60% dos casos, pTa de baixo grau em 20% dos casos e pTis em 20% dos casos.

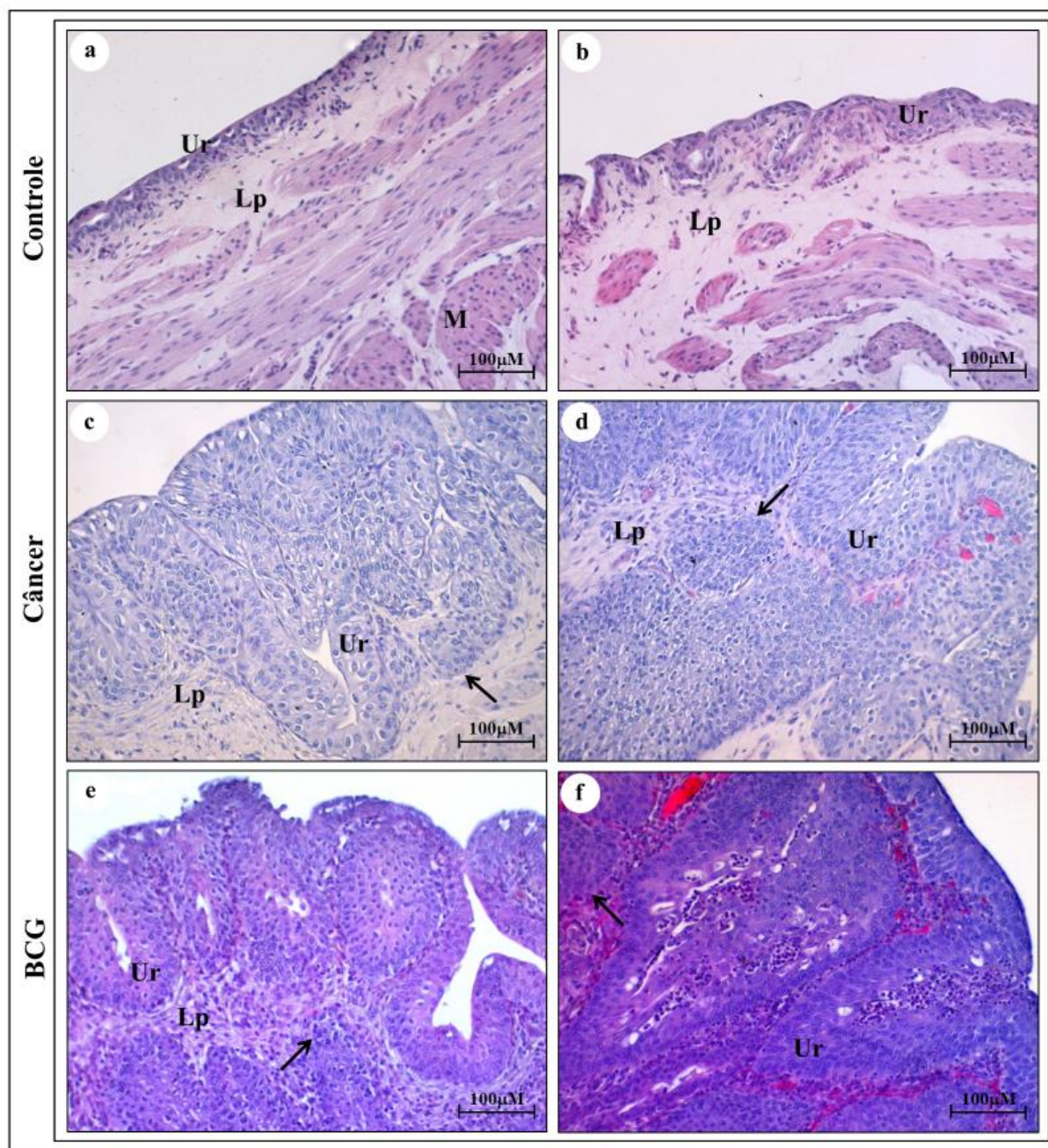


Figura 4: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas das bexigas urinárias dos grupos Controle (**Figuras a, b**), Câncer (**Figuras c, d**) e BCG (**Figuras e, f**). Histologia normal (**Figuras a, b**). Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (*setas*) invadindo a lâmina própria (**Figuras c, d, e, f**). **Figuras a-f:** *Lp* – lâmina própria, *Ur* – urotélio. *M* – muscular própria (**Figura a**).

No tratamento com CLN (Figuras 5a e 5b) observou-se tumores dos tipos pTis (60%) e pTa baixo grau (40%). Em 40% dos casos dos animais tratados com Salan(Ni) (Figuras 5c e 5d) foram observadas lesões no estágio pT1, assim como alterações histopatológicas classificadas como neoplasia intraurotelial de baixo grau (20%) e hiperplasia plana (20%) e ainda foi observado urotélio normal (20%), sendo 20% dos casos associados metaplasia escamosa queratinizante. Nos animais tratados com Salan(Pt) (Figuras 5e e 5f) foram observados carcinoma papilífero de baixo grau (40%), carcinoma papilífero de alto grau (20%), carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (20%), hiperplasia plana (20%) e metaplasia escamosa queratinizante associada a 20% dos casos.

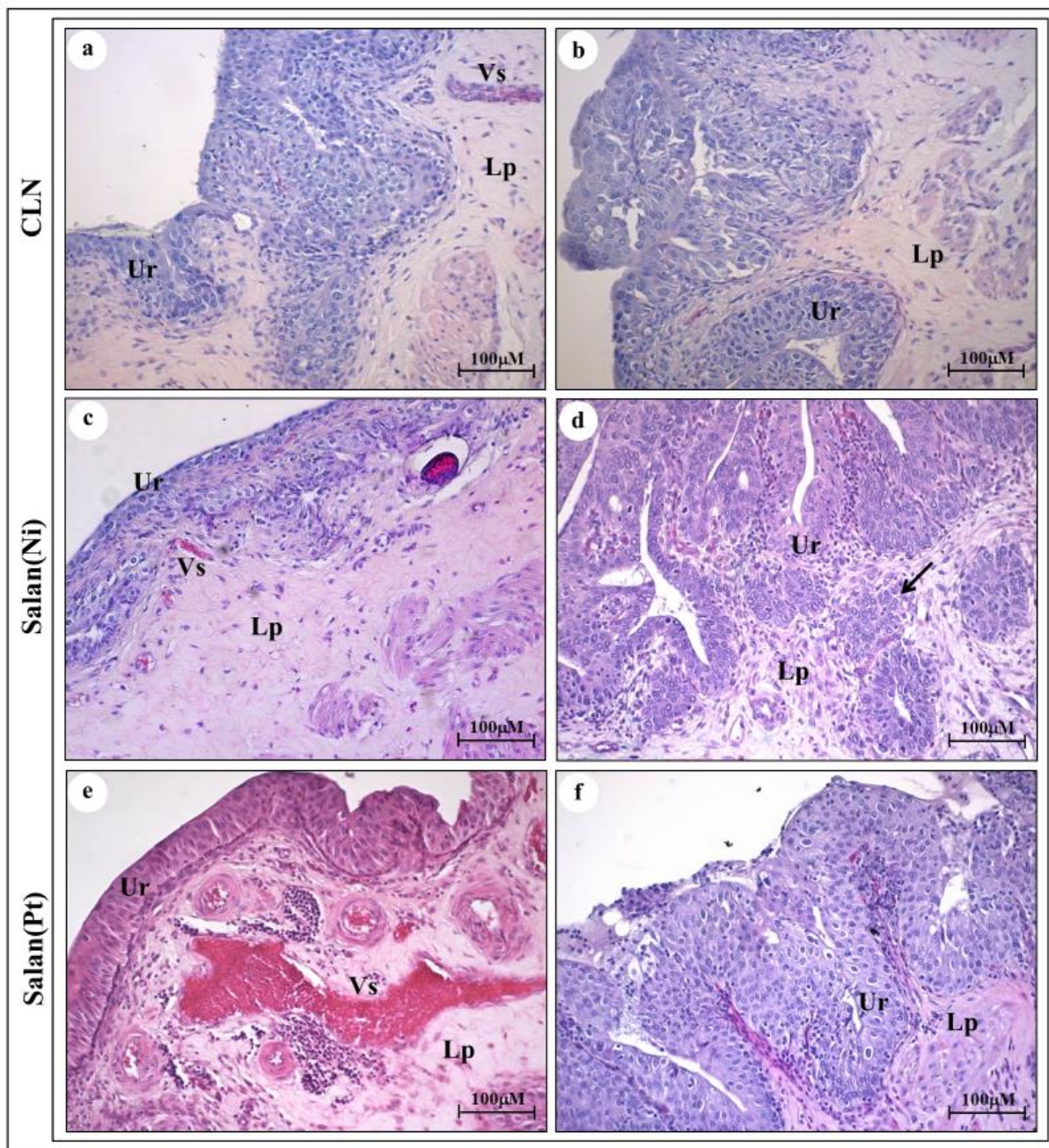


Figura 5: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas das bexigas urinárias dos grupos CLN (**Figuras a, b**), Salan(Ni) (**Figuras c, d**) e Salan(Pt) (**Figuras e, f**). Histologia normal (**Figuras c**). Hiperplasia plana (**Figura e**). Carcinoma *in situ* (pTis) (**Figura a**). Carcinoma papilífero de baixo grau (pTa) (**Figuras b, f**). Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (*setas*) invadindo a lâmina própria (**Figura d**). Vasos sanguíneos (*Vs*) na lâmina própria (**Figuras a, c, e**). **Figuras a-f:** *Lp* – lâmina própria, *Ur* – urotélio.

Nas Figuras 6a e 6b estão representadas as fotomicrografias dos animais tratados com Salan(Pt)-CLN onde é possível observar lesões dos tipos pT1 (20%) e pTa de baixo grau (20%), assim como as alterações histopatológicas: hiperplasia plana (20%), hiperplasia papilífera (20%) e neoplasia intraurotelial de baixo grau (20%).

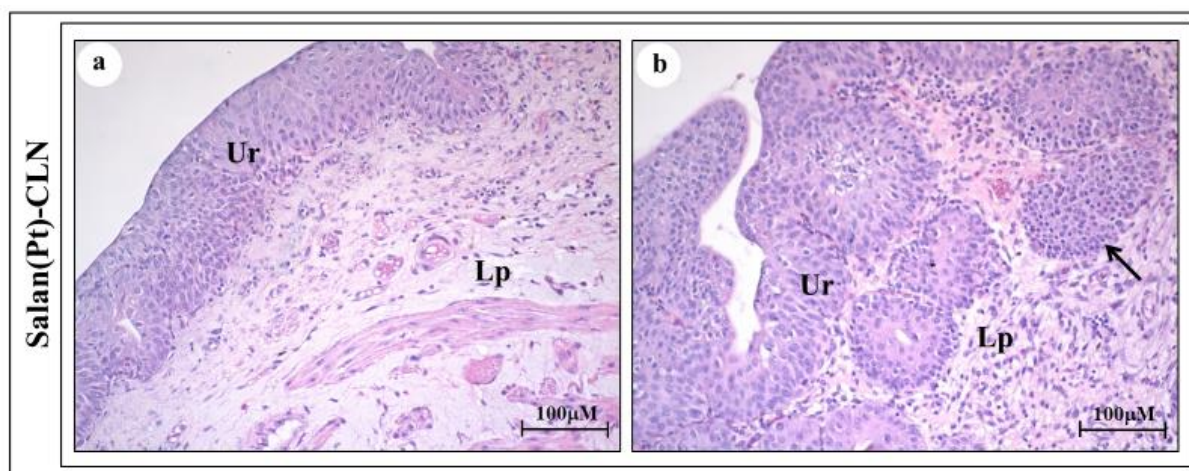


Figura 6: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas das bexigas urinárias dos grupos Salan(Pt)-CLN (**Figuras a, b**). Neoplasia intraurotelial de baixo grau (**Figura a**). Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (*setas*) invadindo a lâmina própria (**Figura b**). **Figuras a-b:** *Lp* – lâmina própria, *Ur* – urotélio.

3.2.3. Determinação dos níveis proteicos das vias de sinalização dos fatores indutores e reparadores de lesão celular (*Akt, PI3K e p53*) e do balanço angiogênico e antiangiogênico (*VEGF e Endostatina*)

Os níveis proteicos de Akt, PI3K, p53, VEGF e endostatina das bexigas urinárias dos animais dos diferentes grupos experimentais foram analisados por WB (Figura 7), sendo que

o grupo Câncer foi usado como padrão de comparação. Os resultados da quantificação das membranas indicaram que os grupos tratados com Salan(Pt)-CLN (7,35%), Salan(Ni) (7,65%) e Salan(Pt) (10,29%) apresentaram níveis proteicos de Akt significativamente menores do que grupo Câncer (18,44%) (Figura 7A). Os níveis da proteína PI3K (Figura 7B) foram significativamente mais baixos nos grupos Salan(Pt) (2,86%), Salan(Pt)-CLN (4,15%) e Salan(Ni) (5,33%) quando comparados ao grupo Câncer (8,34%). É importante notar que os animais que receberam os tratamentos Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN apresentaram níveis proteicos tanto para Akt quanto de PI3K estatisticamente iguais aos do grupo Controle. Além disso, os grupos tratados com BCG (7,63%) e Salan(Ni) (7,39%) apresentaram níveis proteicos significativamente maiores de p53 em relação aos animais do grupo Câncer (5,13%). Porém, os grupos que apresentaram maiores níveis proteicos de p53 foram Salan(Pt)-CLN (11,98%) e Salan(Pt) (11,33%), sendo importante notar que esses níveis foram significativamente mais altos quando comparados aos demais grupos (Figura 7C).

Os resultados de WB também indicaram que os grupos Salan(Ni) (45,55%) e Salan(Pt)-CLN (47,51%) apresentaram níveis proteicos de VEGF significativamente menores do que o grupo Câncer (55,2%) e esses níveis são estatisticamente iguais ao do grupo Controle (Figura 7D). Embora o nível da proteína VEGF no grupo Salan(Pt) (56,94%) tenha sido significativamente igual ao do grupo Câncer, os níveis proteicos de endostatina foram significativamente mais altos nesse grupo (62,35%) e nos grupos Salan(Ni) (56,1%) e Salan(Pt)-CLN (51,13%). Como esperado, o grupo Câncer apresentou os menores níveis proteicos de endostatina (35,58%) (Figura 7E).

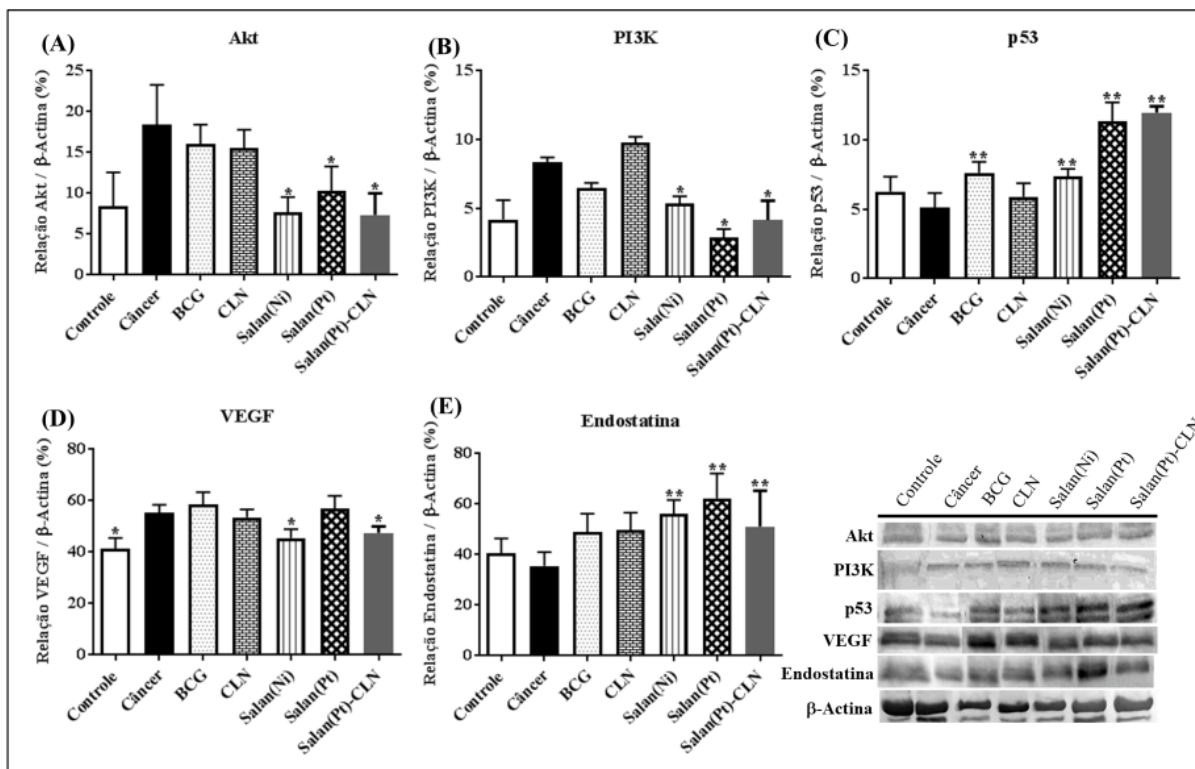


Figura 7: Representação do WB e determinação semi-quantitativa das proteínas Akt (A), PI3K (B), p53 (C), VEGF (D) e endostatina (E) extraídas das bexigas urinárias dos grupos Controle, Câncer, BCG, CLN, Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (n= 05). *Indica níveis proteicos significativamente menores do que o grupo Câncer com P < 0,05; **Indica níveis proteicos significativamente maiores do que o grupo Câncer com P < 0,05.

4. Discussão

No presente estudo, incorporou-se pela primeira vez o complexo Salan(Pt) em um CLN utilizando-se uma técnica mecânica altamente reprodutível e de fácil execução, obtendo-se uma alta eficiência de encapsulação, uma boa estabilidade das nanopartículas produzidas e potente efeito desses compostos na progressão do CBNMI.

Os resultados dos exames de ultrassom comprovaram a eficiência do método de indução e Fávoro *et al.* (2012) relatam que as bexigas tratadas com MNU-citrato intravesicais desenvolvem alterações neoplásicas progressivas e as lesões tornam-se progressivamente menos diferenciados com o tempo. Esses tumores progridem de hiperplasia, atipia, carcinoma *in situ* (CIS) e carcinoma papilar a grandes e volumosos tumores musculares invasivos que preenchem completamente o lúmen da bexiga, obstruem os ureteres e matam o animal.

Outro fator considerado importante foi a descoberta da lipofilicidade dos complexos sintetizados, pois como demonstrado anteriormente (Capítulo II) os compostos precipitam na urina e isso interfere em seus efeitos. As administrações intravesicais dos complexos Salan(Ni) e Salan(Pt), utilizando DMSO 2% em óleo de milho 98% como veículo, reduziram significativamente os estádios do CB em comparação com a imunoterapia com BCG.

É importante notar que a incorporação do complexo Salan(Pt) no CLN melhora significativamente a atividade do complexo. Porém, o tratamento com Salan(Ni) apresentou definitivamente a melhor recuperação histopatológica entre os tratamentos testados, pois além de apresentar 40% de lesões benignas, recuperou 20% dos animais as condições histológicas normais do urotélio. As lesões histopatológicas características dos CBNMIs incluem os estádios pTis, pTa e pT1 (Schenk-Braat & Bangma, 2005). No carcinoma do tipo pTis ou *in situ* é possível observar uma desordenada proliferação das células uroteliais, ou hiperplasia, em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes (Pashos *et al.*, 2002). O carcinoma do tipo pTa, ou papilífero, caracteriza-se por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos. O carcinoma no estágio pTa, ainda pode ser classificado como de baixo ou alto grau, sendo que os tumores de baixo grau apresentam o epitélio predominantemente ordenado com poucas figuras mitóticas, os tumores

de alto grau apresentam um epitélio predominantemente desordenado com figuras mitóticas frequentes em todos os níveis do epitélio (Salmond, 2016). No estágio pT1 o carcinoma urotelial invade a lâmina própria e são evidentes células neoplásicas aglomeradas em pequenos grupos ou cordões invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos maiores.

Os estádios de cânceres de bexiga podem ou não estarem associados à metaplasia escamosa. A metaplasia escamosa da bexiga é definida como a transformação do urotélio normal em epitélio escamoso estratificado e pode ser ou não queratinizante (Alonso *et al.*, 2012). Metaplasia escamosa não queratinizante normalmente ocorre no trígono da bexiga (Ahmad *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2012). Por outro lado, a metaplasia escamosa queratinizante é considerada uma lesão pré-neoplásica em que ocorre a formação excessiva de epitélio escamoso, caracterizada por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear, com descamação e acúmulo do epitélio (Ahmad *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2012).

As alterações histológicas da bexiga urinária também podem incluir lesões benignas como hiperplasia plana, hiperplasia papilífera e neoplasia intraurotelial de baixo grau. Nas hiperplasias planas e papilíferas ocorre o espessamento do urotélio e não são observadas atipias citológicas. A neoplasia intraurotelial de baixo grau caracteriza-se por um aumento do número de camadas celulares no urotélio, hiper cromasia nuclear e displasia.

Os complexos metálicos derivados de BSs são bem conhecidos por sua atividade antineoplásica, porém os exatos mecanismos moleculares de ação destes complexos ainda não são conhecidos (Helal *et al.*, 2010). Significativamente, os dados apresentados sugerem que esses tratamentos diminuíram os níveis de Akt e PI3K e aumentaram os níveis da proteína supressora de tumor p53. Esse mecanismo de ação é semelhante ao da cisplatina que, tem

capacidade para ligar às nucleobases no DNA e ativar proteínas que inibem a quinase dependente de ciclina (CDK) e programam as células para sofrerem apoptose via p53 (Chakraborty *et al.*, 2010). De acordo com Yang *et al.* (2006) p53 é um regulador chave da resposta celular ao estresse celular e é rapidamente regulado positivamente em resposta a agentes prejudiciais ao DNA tais como a cisplatina. Yang *et al.* (2006) ainda demonstraram que Akt é um importante regulador dos níveis de p53 após cisplatina e que o estado p53 funcional é um determinante da quimiorresistência mediada por Akt. A cisplatina pode interromper o ciclo celular em várias fases e induzir a apoptose via p53 (Mitsuuchi *et al.*, 2000). Chang *et al.* (2003) relatam que a divisão celular é coordenada por um número de proteínas incluindo ciclinas e quinases dependentes de ciclina (Cdks). Ainda de acordo com Chang *et al.* (2003) as Cdks existem como monómeros inativos de serina/treonina quinase que se ativam quando ligados a ciclinas específicas e os papéis que estas proteínas reguladoras desempenham na progressão do ciclo celular podem ser modulados pela sinalização PI3K.

Além disso, Salan(Ni) e Salan(Pt)-CLN indicaram serem capazes de inibir a angiogênese, enquanto Salan(Pt) não demonstrou essa capacidade. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes e é considerado um passo fundamental na progressão tumoral e metástase (Du & Hou, 2003; Shibuya & Claesson-Welsh, 2006). Esse processo fisiológico é sistematicamente regulado e envolve um delicado equilíbrio entre fatores angiogênicos e anti-angiogênicos solúveis (Du & Hou, 2003). Os fatores conhecidos por estarem envolvidos na carcinogênese de bexiga humana incluem os fatores de crescimento angiogênicos, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Su *et al.*, 2005). O maior nível proteico de VEGF está envolvido, principalmente, no aumento e promoção da angiogênese (Holash *et al.*, 1999). VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico, permeabilidade da camada de células endoteliais e ainda protege o endotélio da apoptose (Waltenberger,

2009). Vários inibidores endógenos da angiogênese foram identificados, sendo que a endostatina, um fragmento C-terminal do colágeno tipo XVIII, é um dos inibidores de angiogênese mais caracterizados (Du & Hou, 2003). A endostatina induz apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'Reilly et al. 1997; Schmidt *et al.*, 2004). É, portanto, uma potente substância antitumoral, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos (O'Reilly *et al.*, 1997).

As diferenças observadas na atividade antitumoral dos compostos sintetizados e testados podem ser atribuídas a diferença do centro metálico do complexo Salan(Ni) e ao fato de Salan(Pt)-CLN ter sido incorporado em uma nanopartícula. Embora tenham sido obtidos resultados promissores, são necessários estudos adicionais sobre toxicidade e exato mecanismo de ação desses complexos e nanopartículas obtidos para uma possível aplicação clínica. O complexo Salan(Ni) pode ser utilizado como o composto principal em pesquisas futuras, pois apresentou maior eficácia no tratamento do CBNMI induzido quimicamente, tanto em relação aos efeitos histopatológicos quanto moleculares. Por fim, ressalta-se a importância de realizar pesquisas relacionadas à utilização de terapias combinadas desses compostos com agentes quimioterápicos convencionais para tratamento de tumores.

Referências

AHMAD, I.; BARNETSON, R. J.; KRISHNA, N. S. Keratinizing Squamous Metaplasia of the Bladder: A Review. *Urol. Int.*; v.81, pp.247–251, 2008.

ALONSO, F. V.; CAMPOS, R. B.; SANZ, I. P.; SÁNCHEZ, M. S.; HERNANDEZ, J. M. M.; MARTIN, J. F. F.; OLMO, J. M. C. Conservative Management of Unusual Keratinising Squamous Metaplasia of the Bladder in a 28-Year-Old Female and Overview of the Literature. *Case Rep Urol.*; v.2012, pp.1-3, 2012.

BRANDAU, S.; SUTTMANN, H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement. *Biomed. Pharmacother.*; v.61, pp.299-305, 2007.

CHAKRABORTY, A.; KUMAR, P.; GHOSH, K.; ROY, P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur. J. Pharmacol.*; v. 647; pp.1-12, 2010.

CHANG, F.; LEE1, J. T.; NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S.; SHELTON, J. G.; BLALOCK, W. L.; FRANKLIN, R. A.; MCCUBREY, J. A. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*; v.17, pp.590-603, 2003.

CHAVIARA, A. T.; CHRISTIDIS, P. C.; PAPAGEORGIOU, A.; CHRYSOGELOU, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; BOLOS, C. A. In vivo anticancer, anti-inflammatory, and toxicity studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien and its Schiff dibases with heterocyclic aldehydes and 2-amino-2-thiazoline. Crystal structure of [Cu(dien)(Br)(2a-2tzn)](Br)(H₂O). *J. Inorg. Biochem.*; v.99, pp.2102–2109, 2005.

CHEN, C.-H.; CHAN, T.-M.; WU, Y.-J.; CHEN, J.-J. Review: Application of Nanoparticles in Urothelial Cancer of the Urinary Bladder. *J. Med. Biol. Eng.*; v.35, pp.419–427, 2015.

CORREIA, I.; PESSOA, J. C.; DUARTE, M. T.; PIEDADE, M. F. M.; JACKUSH, T.; KISS, T.; CASTRO, M. M. C. A.; GERALDES, C. F. G. C.; AVECILLA, F. Vanadium(IV and V) Complexes of Schiff Bases and Reduced Schiff Bases Derived from the Reaction of Aromatic *o*-Hydroxyaldehydes and Diamines: Synthesis, Characterisation and Solution Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.*; v. 2005, pp.732-744, 2005.

DU, Z. & HOU, S. The Anti-Angiogenic Activity of Human Endostatin Inhibits Bladder Cancer Growth and its Mechanism. *J. Urol.*; v.170, 2000-2003, 2003.

ENYEDY, E. A.; HOLLENDER, D.; KISS, T. Lipophilicity of kinetically labile metal complexes through the example of antidiabetic Zn(II) and VO(IV) compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; v.54, pp.1073–1081, 2011.

EPSTEIN, J. L.; AMIN, M. B.; REUTER, V. R. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.*; v.22, pp.1435-1448, 1998.

FÁVARO, W. J.; NUNES, O. S.; SEIVA, F. R.; NUNES, I. S.; WOOLHISER, L. K.; DURÁN, N.; LENAERTS, A. J. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. *Infect. Agent. Cancer.*; v.7, p.1-14, 2012.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPARA, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Control Release*; v.83; 273-286, 2002.

GARCIA, P. V.; SEIVA, F. R. F.; CARNIATO, A. P.; JÚNIOR, W. M.; DURAN, N.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, A. G.; ROMI, R.; NUNES, I. S.; NUNES, O. S.; FÁVARO, W. J. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*; v.16, pp.1-18, 2016.

GUHASARKAR, S. & BANERJEE, R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J. Control. Release*; v.148, pp.147–159, 2010.

GROSSMAN, H. B.; NATALE, R. B.; TANGEN, C. M.; SPEIGHTS, V.O.; VOGELZANG, N. J.; TRUMP, D. L.; WHITE, R. W. V.; SAROSDY, M. F.; WOOD JR., D. P.; RAGHAVAN, D.; CRAWFORD, E. D. Neoadjuvant Chemotherapy plus Cystectomy Compared with Cystectomy Alone for Locally Advanced Bladder Cancer. *N. Engl. J. Med.*; v.349, pp.859-866, 2003.

HELAL, M.; AL-DOUH, M.; HAMID, S.; OSMAN, H.; SALHIMI, S.; MAJID, A. M. S. A. Diaminobenzene Schiff Base Induces Caspase 9-dependent Apoptosis In U937 Leukemia Cells. *WebmedCentral*; v.1, pp.1-13, 2010.

HOLASH, J.; WIEGAND, S. J.; YANCOPOULOS, G. D. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*; v.18, 5356-5362, 1999.

HSU, J.-W.; KING, M. R. Applications of Nanotechnology in Bladder Cancer Therapy. *J. Healthc. Eng.*; v.3, pp.535–550, 2012.

INBA, P. J. K.; ANNARAJ, B.; THALAMUTHU, S.; NEELAKANTAN, M. A. Salen, reduced salen and N-alkylated salen type compounds: Spectral characterization, theoretical investigation and biological studies. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*; v.104, pp.300-309, 2013.

KAUFMAN, D. S.; SHIPLEY, W. U.; FELDMAN, A. S. Bladder cancer. *Lancet*; v.374,239-249, 2009.

LLORET, F.; MOLLAR, M.; FAUS, J.; JULVE, M.; CASTRO, I. Solution chemistry of *N,N'*-ethylenebis(salicylideneimine) and its copper(nickel(H) and iron(III) complexes. *Inorg. Chim. Acta*; v.189, pp.195-206, 1991.

MAASE, H. V. D.; HANSEN, S. W.; ROBERTS, J. T.; DOGLIOTTI, L.; OLIVER, T.; MOORE, M. J.; BODROGI, I.; ALBERS, P.; KNUTH, A.; LIPPERT, C. M.; KERBRAT, P.; ROVIRA, P. S.; WERSALL, P.; CLEALL, S. P.; ROYCHOWDHURY, D. F.; TOMLIN, I.; VISSEREN-GRUL, C. M.; CONTE, P. F. Gemcitabine and Cisplatin Versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: Results of a Large, Randomized, Multinational, Multicenter, Phase III Study. *J. Clin. Oncol.*; v.17, pp.3068-3077, 2000.

MAJUMDER, A.; ROSAIR, GEORGINA M.; MALLICK, A.; CHATTOPADHYAY, N.; MITRA, S. Synthesis, structures and fluorescence of nickel, zinc and cadmium complexes with the N,N,O-tridentate Schiff base *N*-2-pyridylmethylidene-2-hydroxy-phenylamine. *Polyhedron*; v.25, pp.1753-1762, 2006.

MARTIN, D. T.; HOIMES, C. J.; KAIMAKLIOTIS, H. Z.; CHENG, C. J.; ZHANG, K.; LIU, J.; WHEELER, M. A.; KELLY, W. K.; TEW, G. N.; SALTZMAN, W. M.; WEISS, R. M. Nanoparticles for urothelium penetration and delivery of the histone deacetylase inhibitor belinostat for treatment of bladder cancer. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*; v.9, pp.1124–1134, 2013.

MEHNERT, W. & MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; pp.83-101, 2012.

MITSUUCHI, Y.; JOHNSON, S. W.; SELVAKUMARAN, M.; WILLIAMS, S. J. The Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signal Transduction Pathway Plays a Critical Role in the Expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 Induced by Cisplatin and Paclitaxel. *Cancer Res.*; v.60, pp.5390-5394, 2000.

NIDHIN, M.; INDUMATHY, R.; SREERAM, K. J.; NAIR, B. U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bull. Mater. Sci.*; v.31, pp.93-96, 2008.

O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell.*; v.88, pp.277-285, 1997.

PASHOS, C. L.; BOTTEMAN, M. F.; LASKIN, B. L.; REDAELLI, A. Bladder Cancer – Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Cancer Pract.*; v.10, pp.-311-322, 2002.

REIS, L. O.; FÁVARO, W. J.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; FAZUOLI, M. G.; CAGNON, V. H. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J. Urol.*; v.28, pp.499-505, 2010.

RHIJN, B. W. G. V.; BURGER, M.; LOTAN, Y.; SOLSONA, E.; STIEF, C. G.; SYLVESTER, R. J.; WITJES, J. A.; ZLOTTA, A. R. Recurrence and Progression of Disease in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: From Epidemiology to Treatment Strategy. *Eur. Urol.*; v.56, 430-442, 2009.

RIDDICK, T. M. Zeta-Meter Manual. Zeta, New York, 1968.

SALMOND, J. M. Pathology of tumours of the kidney and urinary tract. *Surgery*; v.34, pp.487-492, 2016.

SCHENK-BRAAT, E. A. M.; BANGMA, C. H. Immunotherapy for superficial bladder cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*; v54, pp.414-423, 2005.

SCHMIDT, A.; SOMMER, F.; OZGÜR, E. Vessels in benign prostatic hyperplasia contain more binding sites for endostatin than vessels in normal prostate tissue. *Eur Urol.*; v.46, pp.765-767, 2004.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.*; v.312, pp.549–560, 2006.

SIMPLÍCIO, A. L.; CLANCY, J. M.; GILMER, J. F. Prodrugs for Amines. *Molecules*; v.13, pp.519-547, 2008.

SOUZA, J. G.; DIAS, K.; SILVA, S. A.; DE REZENDE, L. C.; ROCHA, E. M.; EMERY, F. S.; LOPEZ, R. F. Transcorneal iontophoresis of dendrimers: PAMAM corneal penetration and dexamethasone delivery. *J. Control. Release*; v.28, pp.115-124, 2015.

SU, S.-J.; YEH, T.-M.; CHUANG, W.-J.; HOD, C.-L.; CHANG, K.-L.; CHENG, H.-L.; LIU, H.-S.; CHENG, H.-L.; HSU, P.-Y.; CHOWD, N.-H. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*; v.69, pp.307-318, 2005.

ÜNER, M. & YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int. J. Nanomedicine*; v.2, pp. 289-300, 2007.

WALTENBERGER, J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans.*; v.37, pp.1167-1170, 2009.

YANG, X.; FRASER, M. MOLL, U. M.; BASAK, A.; TSANG, B. K. Akt-Mediated Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer: Modulation of p53 Action on Caspase-Dependent Mitochondrial Death Pathway. *Cancer Res.*; v.66, pp.3126-3136, 2006.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho pode-se concluir que:

- A condensação do aldeído com anilina resultou na formação da BS Salan que, na presença de íons metálicos (Ni e Pt) formou os complexos Salan(Ni) e Salan(Pt);
- Através dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C observou-se que todos os prótons e átomos de carbono foram encontrados em suas regiões esperadas no ligante Salan e complexo Salan(Pt). Os números de carbono, hidrogênio e nitrogênio obtidos a partir dos valores da análise elementar (CHN) estão de acordo com as perdas de massa dos compostos observadas na análise de TG. As conclusões desses estudos corroboram com o modo de ligação discutidas em seus espectros de FTIR do ligante e complexos;
- O complexo Salan(Ni) apresentou efeito citotóxico significativo em células de leucemia mielóide crônica humana (LMC) das linhagens K562 e Lucena-1 de maneira dependente da concentração, e também em células de tumor hepático humano da linhagem HePG2 e de tumor hepático de rato HTC. O efeito citotóxico foi observado apenas no complexo Salan(Ni);
- O tratamento com complexo Salan(Ni) apresentou melhor recuperação histopatológica em comparação aos tratamentos com BCG, Salan e Salan(Pt); melhoras nas funções supressoras de tumor e no controle da angiogênese.
- A BS Salan e seus complexos metálicos Salan(Ni) e Salan(Pt) possuem caráter lipofílico;
- O sistema de agitação mecânica demonstrou ser eficiente para preparo dos CLNs e incorporação do complexo Salan(Pt);
- Os tratamentos com Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN foram capazes de induzir uma recuperação histopatológica dos estádios do CBNMI, sendo considerados alternativas promissoras ao tratamento do CB ou até mesmo outros tipos de câncer;
- Os resultados de WB sugerem que os mecanismos de ação dos tratamentos Salan(Ni), Salan(Pt) e Salan(Pt)-CLN sejam semelhantes ao da cisplatina regulando positivamente a via p53 e que Salan(Ni) e Salan(Pt)-CLN inibem a angiogênese.

Por fim, conclui-se que as avaliações das atividades antitumorais dos compostos sintetizados foram satisfatórias e os complexos apresentaram efeitos sobre a progressão do CBNMI. Além disso, os resultados dos testes utilizando cultura de células, das análises histopatológicas e da quantificação de proteínas por WB permitiram a seleção do complexo

Salan(Ni) como um composto promissor para futuros testes clínicos. Salan(Ni) apresentou efeito antitumoral eficaz tanto *in vitro* quanto *in vivo*, assim como melhoras nas funções supressoras de tumor e no controle da angiogênese.

REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO)

- ABU-SURRAH, A. S.; KETTUNEN, M. Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin. *Curr. Med. Chem.*; v.13, pp.1337-1357, 2006.
- ADIYAT, K. T.; KATKOORI, D.; SOLOWA, M. S. Intravesical Chemotherapy. Em: Bladder Tumors: Molecular Aspect and Clinical Management. Editores: Lokeshwar, V.B., Merseburger, A.S., Hautmann, S.H., Editora: Human Press, pp. 253-270, 2010.
- ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Educ.*; v. 83, pp.728-734, 2006.
- ALLEEMUDDER, A.; BALLARO, A. The physiology and pharmacology of the lower urinary tract. *Surgery*; v.34, pp.326-332, 2016.
- ALMEIDA, A. J.; SOUTO, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Ver.*; v.59, pp.478-490, 2007.
- ANDERSSON, K.-E.; ARNER, A. Urinary Bladder Contraction and Relaxation: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.*; v.84, pp.935-986, 2004.
- ANDREAS, B. O.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*; v.170, pp.964-969, 2003.
- ANTONI, S.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ZNAOR, A.; JEMAL, A.; BRAY, F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur. Urol.*; v.71, pp.96-108, 2017.
- ASKELAND, E. J.; NEWTON, M. R.; O'DONNELL, M. A.; LUO, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv. Urol.*; v.2012, pp.1-14, 2012.
- BAUL, T. S. B.; BASU, S.; DE VOS, D.; LINDEN, A. Amino acetate functionalized Schiff base organotin (IV) complexes as anticancer drugs: synthesis, structural characterization, and in vitro cytotoxicity studies. *Invest. New Drugs*; v.27, pp.419-431, 2009.
- BETTENDORF, O.; PIFFKO, J.; BÄNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol.*; v.40, pp.110-119, 2004.
- BHÖLE, A. & BRANDAU, S. Immune mechanisms in *Bacillus Calmette Guerin* Immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*; v.170, pp.964-969, 2003.
- BÖHLE, A. Recent Knowledge on BCG'S Mechanism of Action in the Treatment of Superficial Bladder Cancer. *Int. Braz. J. Urol.*; v.26, pp.488-502, 2000.
- BRENNAN, P.; BOGILLOT, O.; CORDIER, S.; GREISER, E.; SCHILL, W.; VINEIS, P.; LOPEZ-ABENTE, G.; TZONOU, A.; CHANG-CLAUDE, J.; BOLM-AUDORFF, U.

- JÖCKEL, K.-H.; DONATO, F.; SERRA, C.; WAHRENDORF, J.; HOURS, M.; T'MANNETJE, A.; KOGEVINAS, M.; BOFFETTA, P. Cigarette Smoking and Bladder Cancer in Men: a Pooled Analysis of 11 Case-Control Studies. *Int. J. Cancer*; v.86, pp.289-294, 2000.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; v.54, pp.631-651, 2002.
- BROWN-BORG, H. M.; BODE, A. M.; BARTKE, A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. *Endocrine*.; v.11, pp.41-48, 1999.
- BRUIJNINCX, P. C. A. & SADLER, P. J. J. New Trends for Metal Complexes with Anticancer Activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.12, pp.197-206, 2008.
- BURGER, M.; CATTO, J. W. F.; DALBAGNI, G.; GROSSMAN, H. B.; HERR, H.; KARAKIEWICZ, P.; KASSOUF, W.; KIEMENEY, L. A.; VECCHIA, C. L.; SHARIAT, S.; LOTAN, Y. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *Eur. Urol.*; v.63, 2 234-241, 2013.
- CAPAZ, F. R.; SABAN, R.; BONAMINI, L. V. Vias de administração de fármacos. In: Luiz Biela de Sousa Vale; Ricardo Martins de Oliveira Filho; Roberto de Lucia; Seizi Oga. (Org.). *Farmacologia Integrada*, São Paulo: Editora Atheneu; v. 1, pp.21-32, 1988.
- CHAKRABORTY, A.; KUMAR, P.; GHOSH, K.; ROY, P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur. J. Pharmacol.*; v. 647; pp.1-12, 2010.
- CHANG, H-Q.; JIA, L.; XU, J.; ZHU, T.-F.; XU, Z.-Q.; CHEN, R-H.; MA, T.-L.; WANG, Y.; WU, W.-N. Syntheses, crystal structures, anticancer activities of three reduce Schiff base ligand based transition metal complexes. *J. Mol. Struct.*; v.1106, pp.366-372, 2016.
- CHAVIARA, A. T.; CHRISTIDIS, P. C.; PAPAGEORGIOU, A.; CHRYSOGELOU, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; BOLOS, C. A. In vivo anticancer, anti-inflammatory, and toxicity studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien and its Schiff dibases with heterocyclic aldehydes and 2-amino-2-thiazoline. Crystal structure of [Cu(dien)(Br)(2a-2tzn)](Br)(H₂O). *J. Inorg. Biochem.*; v.99, pp.2102–2109, 2005.
- CHEN, C.-H.; CHAN, T.-M.; WU, Y.-J.; CHEN, J.-J. Review: Application of Nanoparticles in Urothelial Cancer of the Urinary Bladder. *J. Med. Biol. Eng.*; v.35, pp.419–427, 2015.
- CREW, J. P.; O'BRIEN, T.; BRADBURN, M.; FUGGLE, S.; BICKNELL, R.; CRANSTON, D.; HARRIS, A. L. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Relapse and Stage Progression in Superficial Bladder Cancer. *Cancer Research*; v.57, pp.5281-5285, 1997.

- CREW, J. P.; O'BRIEN, T.; BICKNELL, R.; FUGGLE, S.; CRANSTON, D.; HARRIS, A. L. Urinary Vascular Endothelial Growth Factor and its Correlation with Bladder Cancer Recurrence Rates. *J. Urol.*; v.161, pp.799-804, 1999.
- CUMBERBATCH, M. G. K.; COX, A.; TEARE, D.; CATTO, J. W. F. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.*; v.1, pp.1282-1290, 2015.
- DEMIRCI, S.; DOGAN, A.; BASAK, N.; TELCI, D.; DEDE, B.; ORHAN, C.; TUZCU, M.; SAHIN, K.; SAHIN, N.; OZERCAN, İ. H.; SAHIN, F. A Schiff base derivative for effective treatment of diethylnitrosamine-induced liver cancer *in vivo*. *Anticancer Drugs*; v.26, pp.555-564, 2015.
- DIRERSA, W. B. Contribution of Cis and Trans-platinum (II) Complexes in Synthetic Drug and Medicinal Chemistry from the view of Coordination Chemistry. *IJCPA*; v.2, pp.40-47, 2014.
- DOBRUCH, J.; DANESHMAND, S.; FISCH, M.; LOTAN, Y.; NOON, A. P.; RESNICK, M. J.; SHARIAT, S. F.; ZLOTTA, A. R.; BOORJIAN, S. A. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur. Urol.*; v.69, pp.300-310, 2016.
- DOGAN, A.; BASAK, N.; DEMIRCI, S.; TELCI, D.; DEDE, B.; TUZCU, M.; OZERCAN, I. H.; SAHIN, K.; SAHIN, F. A Novel Schiff Base Derivative for Effective Treatment of Azoxymethane Induced Colon Cancer. *IJPSR*, v.5, pp.3544-3550, 2014.
- DOGAN, A.; DEMIRCI, S.; TURKMEN, N. B.; ÇAGLAYAN, A. B.; AYDIN, S.; TELCI, D.; KILIC, E.; SAHIN, K.; ORHAN, C.; TUZCU, M.; EKICI, A. I.; SAHIN, F. Schiff Base-Poloxamer P85 Combination Prevents Prostate Cancer Progression in C57/B16 Mice. *Prostate*; v.76, pp.1454-63, 2016.
- DONG, P.; XU, Z.; JIA, N.; LI, D.; FENG, Y. Elevated expression of p53 gain-of-function mutation R175H in endometrial cancer cells can increase the invasive phenotypes by activation of the EGFR/PI3K/AKT pathway. *Mol. Cancer*, v.8, pp.103-109, 2009.
- DONIN, N. M.; LENIS, A. T.; HOLDEN, S.; DRAKAKI, A.; PANTUCK, A.; BELLDEGRUN, A.; CHAMIE, K. Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J. Urol.*; v.197, pp.14-22, 2017.
- DRAKE, R. L.; MITCHELL, A. W. M.; VOGL, W. Gray's anatomia para estudantes. Rio de Janeiro: Elsevier. 1058p., 2005.
- DU, Z.; HOU, S. The Anti-Angiogenic Activity of Human Endostatin Inhibits Bladder Cancer Growth and its Mechanism. *J. Urol.*; v.170, pp.2000–2003, 2003.

- EBLIN, K. E.; HAU, A. M.; JENSEN, T. J. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: acute studies. *Toxicology.*; v.250, pp.47-54, 2008.
- EL-SHERIF, A. A.; ELDEBSS, T. M. A. Synthesis, spectral characterization, solution equilibria, in vitro antibacterial and cytotoxic activities of Cu(II), Ni(II), Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with Schiff base derived from 5-bromosalicylaldehyde and 2-aminomethylthiophene. *Spectrochim. Acta A*; v.79, pp.1803-1814, 2011.
- ENYEDY, E. A.; HOLLENDER, D.; KISS, T. Lipophilicity of kinetically labile metal complexes through the example of antidiabetic Zn(II) and VO(IV) compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; v.54, pp.1073–1081, 2011.
- EPSTEIN, J. L.; AMIN, M. B.; REUTER, V. R. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.*; v.22, pp.1435-1448, 1998.
- ELSBACH, P.; WEISS, P. A reevaluation of the roles of O₂- dependent and O₂- independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev Infect Dis.*; v.5, pp.843-853, 1983.
- FENG, S. S.; CHIEN, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem. Eng. Sci.*; v.58, pp.4087-4114, 2003.
- FILOMENI, G.; CERCHIARO, G.; FERREIRA, A. M. C.; MARTINO, A.; PEDERSEN, J. Z.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Pro-apoptotic Activity of Novel Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes Depends on Oxidative Stress Induction and Organelle-selective Damage. *J. Biol. Chem.*; v.282, pp.12010-12021, 2007.
- FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell. Res.*; v.312, pp.594-607, 2006.
- FOTEEVA, L. S.; TROFIMOV, D. A.; KUZNETSOVA, O. V.; KOWOL, C. R.; ARION, V. B.; KEPPLER, B. K.; TIMERBAEV, A. R. A quantitative structure–activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; v.55, pp.409-413, 2011.
- FRASER, M. O.; LAVELLE, J. P.; SACKS, M. S.; CHANCELLOR, M. B. The Future of Bladder Control Intravesical Drug Delivery, a Pinch of Pepper, and Gene Therapy. *Rev Urol.*; v.4, pp.1-11, 2002.

- FREEMAN, D. J.; LI, A. G.; WEI, G.; LI, H.; KERTÉSZ, N.; LESCHE, R. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*; v.3; pp.117-130, 2003.
- FREZZA, M.; HINDO, S.; CHEN, D.; DAVENPORT, A.; SCHMITT, S.; TOMCO, D.; DOU, Q. P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.*; v.16, pp.1813-1825, 2010.
- FRY, C. H. The physiology and pharmacology of the urinary tract. *Surgery*; v.31, pp.329-336, 2013.
- FUERTES, M. A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Curr. Med. Chem.*; v.10, pp.257-266, 2003.
- GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.*; v.12, pp. 931-947, 2013.
- GUHASARKAR, S. & BANERJEE, R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. *J. Control. Release*; v.148, pp.147–159, 2010.
- GUPTA, S. C.; HEVIA, D.; PATCHVA, S.; PARK, B.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid. Redox Signal.*; v.16, pp.1295-1322, 2012.
- HALL, M. C.; CHANG, S. S.; DALBAGNI, G.; PRUTHI, R. S.; SEIGNE, J. D.; SKINNER, E. C.; WOLF, J. S. JR.; SCHELLHAMMER, P. F. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol.*; v.178, pp.2314-2330, 2007.
- HAMILTON, W. J. Tratado de Anatomia Humana. 2ªed. Rio de Janeiro: Interamericana. 789 p. 1982.
- HAJREZAIE, M.; HASSANDARVISH, P.; MOGHADAMTOUSI, S. Z.; GWARAM, N. S.; GOLBABAPOUR, S.; NAJIHUSSIEN, A.; ALMAGRAMI, A. A.; ZAHEDIFARD, M.; ROUHOLLAHI, E.; KARIMIAN, H.; FANI, S.; KAMALIDEHGHAN, B.; MAJID, N. A.; ALI, H. M.; ABDULLA, M. A. Chemopreventive Evaluation of a Schiff Base Derived Copper (II) Complex against Azoxymethane-Induced Colorectal Cancer in Rats. *PLoS One*; v.9, pp.1-9, 2014.
- HAYASHI, T.; SENTANI, K.; OUE, N.; ANAMI, K.; SAKAMOTO, N.; OHARA, S.; TEISHIMA, J.; NOGUCHI, T.; NAKAYAMA, H.; TANIYAMA, K.; MATSUBARA, A.; MATSUMOTO, M. Y.

- YASUI, W. Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology*; v.59, pp.710–721, 2011.
- HELAL, M.; AL-DOUH, M.; HAMID, S.; OSMAN, H.; SALHIMI, S.; MAJID, A. M. S. A. Diaminobenzene Schiff Base Induces Caspase 9-dependent Apoptosis In U937 Leukemia Cells. *WebmedCentral*; v.1, pp.1-13, 2010.
- HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A.; NAVARRO, P.; LUZARDO, O. P.; ÁLVAREZ-LEÓN, E. E.; BOADA, L. D.; ZUMBADO, M.; PESTANO, J.; SUÁREZ, J. R.; CHESA, N.; ALMEIDA, M.; VALERÓN, P. F. *Urol. Oncol. Semin. Ori.*; v.30, pp.660–665, 2012.
- HSU, J.-W. & KING, M. R. Applications of Nanotechnology in Bladder Cancer Therapy. *J. Healthc. Eng.*; v.3, pp.535–550, 2012.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 01/03/2017.
- JEVTOVIC, V. Anticancer Activity of Copper (II) Complexes with a Pyridoxal-Semicarbazone Ligand. *Research In Cancer and Tumor*; v.3, pp.1-5, 2014.
- JOSEPH, V.A.; VYAS, K. M.; PANDYA, J. H.; GUPTA, V. K.; JADEJA, R. N. Studies on DNA binding behavior of biologically active Cu(II) complexes of Schiff bases containing acyl pyrazolones and 2-ethanolamine. *J. Coord. Chem.*; v.66, pp.1094-1106, 2013.
- JI-HYUN, C; CHARIS, E. Nuclear-Cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.*; v.65, pp.8096-8100, 2005.
- JÚNIOR, A. N.; FILHO, M. Z.; REIS, R. B. *Urologia Fundamental*. São Paulo: Planmark. 422p. 2010.
- KAMAT, A. M.; HAHN, N. M.; EFSTATHIOU, J. A.; LERNER, S. P.; MALMSTRÖM, P.-U.; CHOI, W.; GUO, C. C.; LOTAN, Y.; KASSOUF, W. Bladder cancer. *Lancet*; v.388, pp.2796-2810, 2016.
- KAUFMAN, D. S.; SHIPLEY, W. U.; FELDMAN, A. S. Bladder cancer. *Lancet*; v.374,239-249, 2009.
- KEMP, T. J.; LUDWIG, A. T.; EAREL, J. K.; MOORE, J. M.; VANOOSTEN, R. L.; MOSES, B.; LEIDAL, K.; NAUSEEF, W. M.; GRIFFITH, T. S. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood.*; v.106, pp.3474-3482, 2005.

- KEREC, M.; BOGATAJ, M.; VERANI, P.; MRHAR, A. Permeability of pig urinary bladder wall: the effect of chitosan and the role of calcium. *Eur. J. Pharm. Sci.*; v.25, pp.113- 121, 2005.
- KHAN, T.; AHMAD, R.; JOSHI, S.; KHAN, A. R. Anticancer potential of metal thiosemicarbazone complexes: A review. *Der Chemica Sinica*; v.6, pp.1-11, 2015.
- KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; MARONI, P.; KOUL, H. K. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett.*; v.282, pp.125-136, 2009.
- KIRKALI, Z.; CHAN, T.; MANOHARAN, M.; ALGABA, F.; BUSCH, C.; CHENG, L.; KIEMENEY, L.; KRIEGMAIR, M.; MONTIRONI, R.; MURPHY, W. M.; SESTERHENN, I. A.; TACHIBANA, M.; WEIDER, J. Bladder Cancer: Epidemiology, Staging and Grading, and Diagnosis. *Urology*; v.66, pp.4-34, 2005.
- KOBAYASHI, S.; NOJIMA, Y.; SHIBUYA, M.; MARU, Y. Nox1 regulates apoptosis and potentially stimulates branching morphogenesis in sinusoidal endothelial cells. *Exp. Cell. Res.*; v.300, pp.455–462, 2004.
- KOGEVINAS, M.; MANNETJE, A.; CORDIER, S.; RANFT, U.; GONZÁLEZ, C. A.; VINEIS, P.; CHANG-CLAUDE, J.; LYNGE, E.; WAHRENDORF, J.; TZONOU, A.; JÖCKEL, K.-H.; SERRA, C.; PORRU, S.; HOURS, M.; GREISER, E.; BOFFETTA, P. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control*; v.14, pp.907-914, 2003.
- KOHN, K. W. & POMMIER, Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.*; v.331, pp.816-827, 2005.
- KNOWLES, M. A.; PLATT, F. M.; ROSS, R. L.; HURST, C. D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.*; v.28, pp.305-316, 2009.
- KOSTOVA, I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*; v.1, pp.1-22, 2006.
- KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*; v.11, pp.265-283, 2000.
- LAMM, D. L.; STOGDILL, V. D.; STOGDILL, B. J.; CRISPEN, R. G. Complications of *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy in 1,278 patients with bladder cancer. *J. Urol.*; v.135, pp.272-274, 1986.

- LLORET, F.; MOLLAR, M.; FAUS, J.; JULVE, M.; CASTRO, I. Solution chemistry of *N,N'*-ethylenebis(salicylideneimine) and its copper(nickel(H) and iron(III) complexes. *Inorg. Chim. Acta*; v.189, pp.195-206, 1991.
- MAHADEVAN, V. Anatomy of the lower urinary tract. *Surgery*; v.34, pp.318-325, 2016.
- MALATS, N.; BUSTOS, A.; NASCIMENTO, C. M.; FERNANDEZ, F.; RIVAS, M.; PUENTE, D.; KOGEVINAS, M.; REAL, F. X. p53 as a prognostic marker for bladder cancer: a metaanalysis and review. *Lancet. Oncol.*; v.6, pp.678–686, 2005.
- MANGERA, A.; OSMAN, N. I.; CHAPPLE, C. R. Anatomy of the lower urinary tract. *Surgery*; v.31, pp.319-325, 2013.
- MARTIN, D. T.; HOIMES, C. J., KAIMAKLIOTIS, H. Z.; CHENG, C. J.; ZHANG, K.; LIU, J.; WHEELER, M. A.; KELLY, W. K.; TEW, G. N.; SALTZMAN, W. M.; WEISS, R. M. Nanoparticles for urothelium penetration and delivery of the histone deacetylase inhibitor belinostat for treatment of bladder cancer. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.*; v.9, pp.1124–1134, 2013.
- MATSSON, P.; PEDERSEN, J. M.; NORINDER, U.; BERGSTRÖM, C. A. S.; ARTURSSON, P. Identification of Novel Specific and General Inhibitors of the Three Major Human ATP-Binding Cassette Transporters P-gp, BCRP and MRP2 Among Registered Drugs. *Pharm. Res.*; v.26, pp.1816-1831, 2009.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; pp.83-101, 2012.
- MITRA, A. P.; DATAR, R. H.; COTE, R. J. Molecular Pathways in Invasive Bladder Cancer: New Insights Into Mechanisms, Progression, and Target Identification. *J. Clin. Oncol.*; v.24, pp.5552-5564, 2006.
- MORALES, A. EIDINGER, D.; BRUCE, A.W. *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J. Urol.*; v.115, pp.377-380, 1976.
- MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; v.50, pp.161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.*; v.242, pp.121–128, 2002.
- O'BRIEN, T.; CRANSTON, D.; FUGGLE, S.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L. Different Angiogenic Pathways Characterize Superficial and Invasive Bladder Cancer. *Cancer Research*; v.55, pp.510-513, 1995.

- OKI, E.; TOKUNAGA, E.; NAKAMURA, T.; UEDA, N.; FUTATSUGI, M.; MASHINO, K. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Letters*; v.227, pp.33-38, 2005.
- O'REILLY, M. S.; BOEHM, T.; SHING, Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell.*; v.88, pp.277-285, 1997.
- OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*; v.9, pp.667-676, 2004.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.*; v.366, pp.170-184, 2009.
- PARSONS, C. L. The role of a leaky epithelium and potassium in the generation of bladder symptoms in interstitial cystitis/overactive bladder, urethral syndrome, prostatitis and gynaecological chronic pelvic pain. *BJU Int.*; v.107, pp.370-375, 2010.
- PASHOS, C. L.; BOTTEMAN, M. F.; LASKIN, B. L.; REDAELLI, A. Bladder Cancer – Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Cancer Pract.*; v.10, pp.-311-322, 2002.
- PATLOLLA, R. R.; CHOUGULE, M.; PATEL, A. R.; JACKSON, T.; TATA, P. N. V.; SINGH, M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *J. Control. Release*; v.144, pp.233-241, 2010.
- PATRA, M.; JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. A potent glucose-platinum conjugate exploits glucose transporters and preferentially accumulates in cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*; v.55, pp.2550-2554, 2016.
- PLATE, K. H.; BREIER, G.; WEICH, H. A.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature*; v.359, pp.845-848, 1992.
- PUGLIA, C. & BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opin. Drug Deliv.*; v.9, pp.429-441, 2012.
- PUZIO-KUTER, A. M.; CASTILLO-MARTIN, M.; KINKADE, C. W.; WANG, X.; SHEN, T. H.; MATOS, T.; SHEN, M. M.; CORDON-CARDO, C.; ABATE-SHEN, C. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes & development*; v. 23, pp.675–680, 2009.
- QIAO, X.; MA, Z.-Y.; XIE, C.-Z.; XUE, F.; ZHANG, Y.-W.; XU, J.-Y.; QIANG, Z.-Y.; LOU, J.-S.; CHEN, G.-J.; YAN, S.-P. Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper(II) complex: Synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *J. Inorg. Biochem.*; v.105, pp.728–737, 2011.

- RAMA, I.; SELVAMEENA, R. Synthesis, structure analysis, anti-bacterial and *in vitro* anti-cancer activity of new Schiff base and its copper complex derived from sulfamethoxazole. *J. Chem. Sci.*; v.127, pp.671–678, 2015.
- REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M. S.; BOCHNER, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective. *Nat. Rev. Urol.*; v. 11, pp.153–162, 2014.
- REEDIJK, J. New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; v.100, pp.3611–3616, 2003.
- RHIJN, B.W.G.V.; CATTO, J.W.; GOEBELL, P.J.; KNÜCHEL, R.; SHARIAT, S.F.; POEL, H.G.V.D.; CARBAYO, M.S.; THALMANN, G.N.; DRÄGER, B.J.S.; KIEMENEY, L.A. Molecular markers for urothelial bladder cancer prognosis: Toward implementation in clinical practice. *Urol. Oncol-Semin. Ori.*; v.32, pp.1078–1087, 2014.
- RIJT, S. H. V.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today*; v.14, pp.1089-1097, 2009.
- RO, J. Y.; STAERKEL, G. A.; AYALA, A. G. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.*; v.19, pp. 435–453, 1992.
- RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord. Chem. Ver.*; v.251, pp.1633–1648, 2007.
- RUIZ, J.; RODRÍGUEZ, V.; CUTILLAS, N.; ESPINOSA, A.; HANNON, M. J. Novel C,N-chelate platinum(II) antitumor complexes bearing a lipophilic ethisterone pendant. *J. Inorg. Biochem.*; v.105, pp.525–531, 2011.
- RUTKOWSKA, E.; PAJK, K.; JOZWIAK, K. Lipophilicity - Methods of Determination and its Role in Medicinal Chemistry. *Acta Pol. Pharm.*; v.70, pp.3-18, 2013.
- SCHAMHART, D. H.; BOER, E. C.; REIJKE, T. M. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur. Urol.*; v.37, pp.16, 2000.
- SCHMIDT, A.; SOMMER, F.; OZGÜR, E. Vessels in benign prostatic hyperplasia contain more binding sites for endostatin than vessels in normal prostate tissue. *Eur. Urol.*; v.46, pp.765-767, 2004.
- SCHELLENS, J. H. M.; MALINGRÉ, M. M.; KRUIJTZER, C. N. F.; BARDELMEIJER, H. A.; TELLINGEN, O.; SCHINKEL, A. H.; BEIJNEN, J. H. Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *Eur. J. Pharm. Sci.*; v.12, pp.103-110, 2000.

- SCHUCH, G.; HEYMACH, J.V.; NOMI, M.; MACHLUF, M.; FORCE, J.; ATALA, A.; EDER, J.P.; JR., FOLKMAN, J.; SOKER, S. Endostatin Inhibits the Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Mobilization of Endothelial Progenitor Cells. *Cancer Research.*; v.63, pp.8345–8350, 2003.
- SEGAL, A. W.; SHATWELL, K. P. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; v.832, pp.215-222, 1997.
- SERONT, E.; PINTO, A.; BOUZIN, C.; BERTRAND, L.; MACHIELS, J.-P.; FERON, O. PTEN deficiency is associated with reduced sensitivity to mTOR inhibitor in human bladder cancer through the unhampered feedback loop driving PI3K/Akt activation. *Br. J. Cancer*; v.109, pp.1586-1592, 2013.
- SHARIAT, S. F.; SFAKIANOS, J. P.; DROLLER, M. J.; KARAKIEWICZ, P. I.; MERYN, S.; BOCHNER, B. H. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int.*; v.105, pp.300-308, 2010.
- SHIMADA, K.; FUJII, T.; ANAI, S.; FUJIMOTO, K.; KONISHI, N. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BMC Urol.*; v.11, pp.22, 2011.
- SHUKLA, S.; MACLENNAN, G. T.; HARTMAN, D. J.; FU, P.; RESNICK, M. I.; GUPTA, S. Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *Int. J. Cancer*; v.121, pp.1424-1432, 2007.
- SILVA, C. M.; SILVA, D. L.; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; RESENDE, M. A.; MARTINS, C. V. B.; FÁTIMA, A. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *J. Adv. Res.*; v.2, pp.1-8, 2011.
- SMITH, E. B.; SCHWARTZ, M.; KAWAMOTO, H.; YOU, X.; HWANG, D.; LIU, H.; SCHERR, D. S. Antitumor Effects of Imidazoquinolines in Urothelial Cell Carcinoma of the Bladder. *J. Urol*; v. 177, pp.2347-2351, 2007.
- SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MULLER, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.*; v.278, pp.71–77, 2004.
- STECK P. A.; PERSHOUSE M. A.; JASSER S. A.; YUNG W. K.; LIN H.; LIGON A. H.; LANGFORD L. A; BAUMGARD M. L.; HATTIER T.; DAVIS T.; FRYE C.; HU R.; SWEDLUND B.; TENG D. H.; TAVTIGIAN S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers". *Nat. Genet.*; v.15, p.356-362, 1997.

- STEIN, J. P.; LIESKOVSKY, G.; COTE, R.; GROSHEN, S.; FENG, A.-C.; BOYD, S.; SKINNER, E.; BOCHNER, B.; THANGATHURAI, D.; MIKHAIL, M.; RAGHAVAN, D.; SKINNER, D. G. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients. *J. Clin. Oncol.*; v.19, pp. 666-675, 2001.
- SUN, T.-T. Altered Phenotype of Cultured Urothelial and Other Stratified Epithelial Cells: Implications for Wound Healing. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*; v.291, pp. 9-21, 2006.
- SYLVESTER, R. J.; VAN DER MEIJDEN, A. P.; LAMM, D. L. Intravesical *Bacillus Calmette-Guerin* reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J. Urol.*; v.168, pp.1964-1970, 2002.
- TABASSUM, S.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. New heterobimetallic $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Sn}^{\text{IV}}_2$ complex as potential topoisomerase I inhibitor: In vitro DNA binding, cleavage and cytotoxicity against human cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*; v.115, pp.63-72, 2012.
- TOLEDO, F. & WAHL, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev.*; v.6, pp.909-923, 2006.
- TSURUTA, H.; KISHIMOTO, H.; SASAKI, T.; HORIE, Y.; NATSUI, M.; SHIBATA, Y.; HAMADA, K.; YAJIMA, N.; KAWAHARA, K.; SASAKI, M.; TSUCHIYA, N.; ENOMOTO, K.; MAK, T. W.; NAKANO, T.; HABUCHI, T.; SUZUKI, A. Hyperplasia and Carcinomas in Pten-Deficient Mice and Reduced PTEN Protein in Human Bladder Cancer Patients. *Cancer Res.*; v.66, pp.8389-8396, 2006.
- ÜNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int. J. Nanomedicine*; v.2, pp. 289-300, 2007.
- USHIO-FUKAI, M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.*; v.71, pp.226-235, 2006.
- VARA, J. A. F.; CASADO, E.; CASTRO, J.; CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C.; GONZALEZ-BARON, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.*; v.30, pp.193-204, 2004.
- VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; CHAUVIERRE, C.; BRIGGER, I.; COUVREUR, P. Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Control. Release*; v.93, pp.151-160, 2003.
- WALTENBERGER, J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans.*; v.37, pp.1167-1170, 2009.
- WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*; v.4, pp.307-320, 2005.

- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; v.56, pp.1257– 1272, 2004.
- WONG, H. L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*; v.59, pp.491-504, 2007.
- WONG-YOU-CHEONG, J. J.; WOODWARD, P. J.; MANNING, M. A., SESTERHENN, I. A. Neoplasms of the urinary bladder: radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics.*; v.26, pp.553-580, 2006.
- XU, G.; ZHANG, W.; BERTRAM, P.; ZHENG, X. F.; MCLEOD, H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int. J. Oncol.*; v.24, pp.893-900, 2004.
- YAN, X; FRASER, M.; QIU, Q.; TSANG, B. K. Over-expression of PTEN sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *Oncology*; v.5, pp.1-8, 2006.
- YANG, J.; SHI, R.; ZHOU, P.; QIU, Q.; LI, H. Asymmetric Schiff bases derived from diaminomaleonitrile and their metal complexes. *J. Mol. Struct.*; v.1106, pp.242-258, 2016.
- YANG, X.; FRASER, M. MOLL, U. M.; BASAK, A.; TSANG, B. K. Akt-Mediated Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer: Modulation of p53 Action on Caspase-Dependent Mitochondrial Death Pathway. *Cancer Res.*; v.66, pp.3126-3136, 2006.
- YANG, X. B.; HUANG, Y.; ZHANG, J. S.; YUAN, S. K.; ZENG, R. Q. Synthesis, characterization and DNA interaction of copper (II) complexes with Schiff base ligands derived from 2-pyridinecarboxaldehyde and polyamines. *Inorg. Chem. Commun.*; v.13, pp.1421-1424, 2010.
- ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*; v.7, pp.481-489, 2003.
- ZHANG, N.; FAN, Y.; ZHANG, Z.; ZUO, J.; ZHANG, P.; WANG, Q.; LIU, S. Syntheses, crystal structures and anticancer activities of three novel transition metal complexes with Schiff base derived from 2-acetylpyridine and l-tryptophan. *Inorg. Chem. Commun.*; v.22, pp. 68-72, 2012a.
- ZHANG, Y.; WANG, Z.; YU, J.; SHI, J. Z.; WANG, C.; FU, W. H.; CHEN, Z. W.; YANG, J. Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett.*; v.322, pp.70–77, 2012b.

ZHOU, G.; CHENA, X.; ZHANG, J.; ZHU, J.; ZONG, G.; WANG, Z. Contrast-enhanced dynamic and diffusion-weighted MR imaging at 3.0 T to assess aggressiveness of bladder cancer. *Eur. J. Radiol.*; v.83, pp.2013–2018, 2014.

ANEXO I



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos dos Complexos de Níquel e Platina Derivados de base de Schiff versus Imunoterapia com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) na Progressão do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo" (protocolo nº 3606-1), sob a responsabilidade de Wagner Jose Favaro / Mirian Yoshiko Matsumoto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 03 de novembro de 2014.

Campinas, 03 de novembro de 2014.

Handwritten signature of Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Handwritten signature of Fátima Alonso.

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeitos dos Complexos de Níquel e Platina Derivados de base de Schiff versus Imunoterapia com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) na Progressão do Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo**, registrada com o nº **4332-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Wagner José Fávaro e Mirian Yoshiko Matsumoto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **12 de setembro de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/10/2016-31/03/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/10/2016-31/03/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / Ficher 344/NTacUnib
No. de animais:	40
Peso / Idade:	08 semanas / 170g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 12 de setembro de 2016.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

ANEXO III

Imagens dos animais e procedimento experimental apresentado nos capítulos II e III

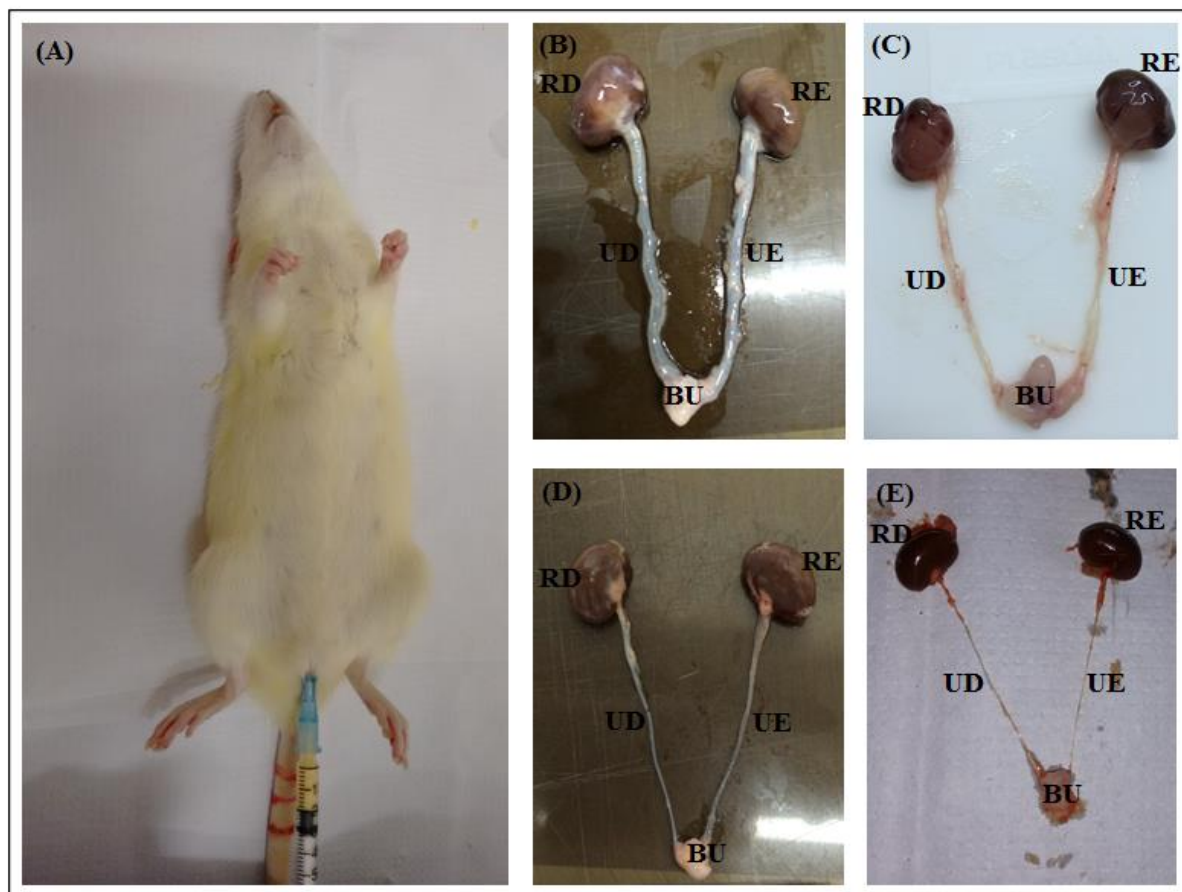


Figura 1: Foto representativa do procedimento de sondagem vesical para indução do CBNMI e tratamento (A). Efeitos dos tratamentos no trato urinário dos animais dos grupos Salan em DMSO (B), Salan(Pt) em DMSO (C), Salan(Ni) em DMSO (D) e Salan(Pt)-CLN (E); Em (B) e (C) hidroureter e hidronefrose; (D) hidroureter e hidronefrose moderados; (E) características normais do trato urinário; B - E: RE - rim esquerdo, UE - ureter esquerdo, RD - rim direito, UE - ureter direito, BU - bexiga urinária.


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 01
Procedimento: DIRPA-PQ006			

6. Inventor (72):
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: WAGNER JOSÉ FÁVARO

6.2 Qualificação: BRAS, DIV. PROF. UNIV

6.3 CPF: 286.246.388-44

6.4 Endereço Completo: Av. Eng. Augusto Figueiredo, 357, em Campinas - SP

6.5 CEP: 13045-603

6.6 Telefone: 19 3521.6104

6.7 FAX:

6.8 E-mail: wjfavaro@gmail.com

 continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa nº 17/2013:
 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome: FERNANDA LAVRAS COSTALLAT SILVADO

9.2 CNPJ/CPF: 295.166.068-57

9.3 API/OAB: 210.899

9.4 Endereço Completo: PROCURADORIA GERAL DA UNICAMP, EM CAMPINAS - SP

9.5 CEP: 13083-970

9.6 Telefone: 19 3521-4771

9.7 FAX: 19 3521-4944

9.8 E-mail: proc-geral@pg.unicamp.br

 continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3	
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001	Versão:
				Procedimento:	DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

Documentos Anexados			folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	1
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	19
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	7
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, <u>1</u> por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	4
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Listagem de seqüências - Declaração de acordo com a Resolução INPI nº 70/2013.	
<input type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar)	

 12. Total de folhas anexadas: 33 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

CAMPINAS, SP, EM 24.02.2017

Local e Data

 FERNANDA LAVRA **Assinatura: Carimbo**
 Procuradora de Universidade Subchefe
 Matrícula nº 309279
 OAB/SP nº 210.899