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

PG-BGA

EFEITOS DAS FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS DE DOXORRUBICINA E CISPLATINA EM DISPERSÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO NO TRATAMENTO DA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

RENATA ABREU VILLELA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia celular e estrutural.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

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

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

BOTUCATU – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DAS FORMULAÇÕES NANOESTRUTURADAS DE DOXORRUBICINA E CISPLATINA EM DISPERSÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO NO TRATAMENTO DA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO

RENATA ABREU VILLELA

PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia celular e estrutural.

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

BOTUCATU – SP
2015

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

Villela, Renata Abreu.
Efeitos das formulações nanoestruturadas de doxorrubicina e cisplatina em dispersão de óxido de grafeno reduzido no tratamento da progressão do câncer de bexiga não-músculo invasivo / Renata Abreu Villela. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Wagner José Fávaro
Capes: 20601000

1. Bexiga - Câncer - Tratamento. 2. Doxorrubicina. 3. Grafeno. 4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Câncer de bexiga não-músculo invasivo; Cisplatina; Doxorrubicina; Óxido de grafeno reduzido.

DEDICATÓRIA

.

Aos meus pais cuja educação e sábias lições me trouxeram até aqui, e com muito amor me ouve, mima e aconselha nas mais variadas situações, apoiando e acreditando nas escolhas para realizar meus sonhos.

À minha irmã pelos momentos de apoio, carinho e confiança.

Aos que sofrem com câncer, seus familiares e amigos e aos profissionais da saúde que de uma forma ou outra acompanham a dor e sofrimento de quem tem esta doença tão agressiva e angustiante.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe
e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa chega ao fim! Uma jornada na qual a dedicação e persistência foram essenciais, porém não foi uma conquista solitária, ao contrário, uma contribuição de tantas pessoas que durante esse período o qual é acometido por inúmeros surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço e alegria, mantiveram presentes para a realização e merecem meus sinceros agradecimentos.

À Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo de esperanças, mostrando o caminho e me protegendo sempre.

Aos meus queridos pais Jorge e Fátima que são meus alicerces, razão de vida, além de referência ao longo de toda minha existência, incentivadores, imenso amor, constante estímulo, enorme dedicação, paciência, compreensão, meus valorosos ensinamentos.

À minha irmã Paula que não faz ideia do quanto é imprescindível em minha vida, pela amizade, companheirismo e sempre torcer por mim.

Ao meu orientador Professor Dr. Wagner José Fávaro, exemplo de profissionalismo, ética, entusiasmo e sensatez. Agradeço pela oportunidade, confiança depositada, credibilidade, maturidade científica, compreensão, me mostrar um caminho mesmo quando todos os resultados pareciam ruins, motivação e otimismo constante, seu precioso tempo dedicado à minha formação, obrigada pela convivência e enriquecimento do meu conhecimento. Muito obrigada por sua inesquecível passagem em minha vida.

Ao Dr. Helder Ceraglioli por fornecer a amostra de óxido de grafeno reduzido e ceder a infraestrutura de seu laboratório em alguns momentos para desenvolvimento da pesquisa, sempre bastante cauteloso e curioso pelos resultados.

Ao Professor Dr. Nelson Durán por permitir a utilização de seu laboratório e equipamentos, além de disponibilidade para discussão e ensinamento.

Ao Nori, pela sua competência como técnico, por sempre estar disposto a ajudar, compreensão e pela amizade permitindo o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas do Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (LCURGIM) que me acompanharam durante a realização deste trabalho, por toda a contribuição e horas de trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp.

Aos que estão longe estando constantemente ao meu lado ainda que apenas em pensamento e acreditando no meu trabalho compreenderam minha “aparente” ausência e comprovamos que a distância não é suficiente para nos separar.

Às amigas de república pela paciência em acompanhar o ritmo deste trabalho, por "suportarem" as inconstâncias de humor, me fazerem rir, motivar, me incluírem em seus círculos de amizade, compartilharem comigo tão bons momentos e por estarem ao meu lado.

À Professora Dra. Raquel Domenicomi, Prof. Dr. Sérgio Pereira e a Dra. Marcela Durán que participaram da banca do exame de qualificação, a participação de vocês foi enriquecedora, o meu muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora de defesa de dissertação por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao LCURGIM pela infraestrutura para realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta etapa, bem como meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estádios do câncer de bexiga urinária. 27

Figura 2: Representação da estrutura química do N-metil-N-nitrosuréia (MNU)..... 28

Figura 3: Transdução de sinais. O estímulo de um receptor de superfície celular por sinal extracelular desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, transferindo informações que promovem a resposta celular..... 30

Figura 4: Via de sinalização EROS e Nrf2. 31

Figura 5: Via de sinalização de PTEN e PI3K. 35

Figura 6: Estrutura química da cisplatina. 37

Figura 7: Via de ação da cisplatina na célula. A- entrando na célula; B- no citoplasma, C- no núcleo. 38

Figura 8: Estrutura química da doxorrubicina. 41

Figura 9: Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono: a- grafite; b- diamante; c- fulerenos; d- C540; e- C70; f- carbono amorfo; g- nanotubos de carbono de parede simples; h- nanotubos de carbono de parede múltipla; i-grafeno. 46

Figura 10: Representação esquemática do modo de dispersão do solvente: "loading from" e "loading to". 49

Figura 11: Representação da estrutura química do copolímero Pluronic® F-68. 50

Figura 12: a- Representação da localização da bexiga urinária. b- Representação da bexiga urinária. 53

Figura 13: Representação dos tipos celulares componentes do urotélio: células basais, células intermediárias, células do tipo "guarda-chuva"..... 53

Figura 14: Representação esquemática da adesão dos quimioterápicos na dispersão de rGO/PF-68. 62

Figura 15: (a,c,d) Fotografias do modelo de indução CBNMI. (b) Abocath® utilizado para instilação intravesical do MNU. 63

Figura 16: Representação esquemática dos grupos de animais. 64

Figura 17**:** MEV-FEG do rGO 70

Figura 18: Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS) Analise do C_1s do rGO (a) e padrão de GO (b). 70

Figura 19: Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS) análise do O1s do rGO(a) e do padrão GO (b). 71

Figura 20: XDRrGO (a) e do padrão de GO (b). 71

Figura 21: Espectroscopia de Raman de rGO (a) e GO (vermelho) e rGO (rosa)(b). 72

Figura 22: Espectroscopia do UV-Vis padrão de GO em λ 230 nm e rGo em λ 265 nm. 72

Figura 23: Espectro de FTIR rGO (Figura a) e espectro de GO padrão (Figura b). 73

Figura 24: Imagens representativas da exposição da cavidade abdomino-pélvica dos animais dos Grupos Controle e Câncer (A), Câncer+rGO (B) e Câncer+rGO+CIS, Câncer+rGO+DOXO, Câncer+rGO+CIS+DOXO (C). (A) e (C) Aspectos normais das vísceras abdominais e peritônio. (B) Presença de aglomerados escuros (**setas**) no peritônio. A – C: **BU –** bexiga urinária, **ID –** intestino delgado, **PT –** peritônio, **UT –** útero. 76

Figura 25: Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos Controle (A, B), Câncer (C, D), Câncer+rGO (E), Câncer+rGO+CIS (F), Câncer+rGO+DOXO (G) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (H). (A) e (B) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (cabeça Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos Controle (A, B), Câncer (C, D), Câncer+rGO (E), Câncer+rGO+CIS (F), Câncer+rGO+DOXO (G) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (H). (A) e (B) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**), uma camada intermediária de células (**cabeça de seta aberta**), e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**seta**). (C) e (D) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**estrelas**) invadindo a lâmina própria; figuras de mitose (setas); metaplasia escamosa (**Me**) associada ao carcinoma pT1. (E) e (F) Carcinoma urotelial papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com intensa atipia (**setas**), arranjo desordenado e com perda da polaridade. (G) Carcinoma in situ (pTis), caracterizado por atipia celular: núcleos volumosos (**setas**) com citoplasma reduzido e nucléolos proeminentes. (H) Hiperplasia plana composta por diversas camadas celulares no urotélio e ausência de atipias citológicas. A – H: **Lp –** lâmina própria, **M –** camada muscular, **Ur –** urotélio. Coloração: Hematoxilina e Eosina. 79

Figura 26: Níveis de TGO em ratas Fischer 344 (a). Níveis de TGP em ratas Fischer 344 (b). 80

Figura 27: Níveis de creatinina em ratas Fischer 344.....81

Figura 28: Níveis de uréia em ratas Fischer 344.....82

Figura 29: Imunomarcação da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (A, G), Câncer (B, H), Câncer+rGO (C, I), Câncer+rGO+CIS (D, J), Câncer+rGO+DOXO (E, K) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (F, L). (A) Fraca imunomarcação para NOX1 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. (B), (C), (D), (E) Intensa imunomarcação para NOX1 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. (F) Moderada imunomarcação para NOX1 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. (G) Intensa imunomarcação para Nrf2 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. (H), (I), (J), (K) Fraca

imunomarcação para Nrf2 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. (L) Moderada imunomarcação para Nrf2 (asteriscos) no citoplasma das células uroteliais. A – L: LP – lâmina próprria, Ur – urotélio.....84

Figura 30: Imunomarcação da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (A, G), Câncer (B, H), Câncer+rGO (C, I), Câncer+rGO+CIS (D, J), Câncer+rGO+DOX (E, K) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (F, L). (A) Imunomarcação para PI3K ausente no urotélio. (B), (C), (D), (E) Intensa imunomarcação para PI3K no citoplasma (asteriscos) e núcleo (setas) das células uroteliais. (F) Fraca imunomarcação para PI3K no citoplasma (asteriscos) e núcleo (setas) das células uroteliais. (G) Intensa imunomarcação para PTEN no citoplasma (asteriscos) e núcleo (setas) das células uroteliais. (H), (I), (J), (K) Fraca imunomarcação para PTEN no citoplasma (asteriscos) e núcleo (setas) das células uroteliais. (L) Moderada imunomarcação para PTEN no citoplasma (asteriscos) e núcleo (setas) das células uroteliais. A – L: LP – lâmina próprria, Ur – urotélio.....85

Figura 31: Espectro típico de absorção do infravermelho Transformada de Fourier das bexigas dos grupos de estudo em análise, e as formulações a que cada grupo de tratamento foi submetido com suas bandas determinadas. Controle (a), Câncer (b), formulação de rGo (c), grupo tratado com rGO (d), formulação de rGo+CIS (e), grupo tratado com rGO+CIS (f), formulação de rGo+DOXO (g), grupo tratado com rGO+DOXO (h), formulação de rGo+CIS+DOXO (i), grupo tratado com rGO+CIS+DOXO (j).....92

Figura 32: Espectro típico de raman das bexigas dos grupos de estudo em análise, e as formulações a que cada grupo de tratamento foi submetido com seus picos determinados. Controle (a), Câncer (b), formulação de rGo (c), grupo tratado com rGO (d), formulação de rGo+CIS (e), grupo tratado com rGO+CIS (f), formulação de rGo+DOXO (g), grupo tratado com rGO+DOXO (h), formulação de rGo+CIS+DOXO (i), grupo tratado com rGO+CIS+DOXO (j).....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC), 2002....25

Tabela 2: EDS Análise do óxido de grafeno reduzido.....69

Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária de ratos dos grupos Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).....78

Tabela 4: Intensidade da imunomarcação para os diferentes antígenos na bexiga urinária dos grupos Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).....86

Tabela 5: Análise do espectro de FTIR das bexigas urinárias Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).....94

Tabela 6: Análise do espectro de Raman das bexigas urinárias Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).....101

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

~ – aproximadamente igual

°C – graus Celsius
µm – micrómetro
1D – uma dimensão
2D - bidimensional
2Θ - graus
3D - tridimensional
AKT - gene homólogo ao oncogenes viral v-Akt
Ar^+ - argônio
ARE – *antioxidant response element*
ATR – reflexão total atenuada
BCG – Bacillus de Calmette-Guérin
BSA – albumina soro bovina
C – carbono
CB – câncer de bexiga urinária
CBNMI – carcinoma de bexiga urinária não-músculo invasivo
Cdc42 – *cell division cycle* 42

CDK - cinase dependente de ciclina
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CIS - cisplatina
cm – centímetro
Cu - cobre
DAB – diaminobenzidina
DMSO - dimetilsufóxido
DNA – ácido desoxiribonucleico
DOXO - doxorrubicina
DUOX – *dual oxidase*
EDS – energia dispersiva de raio X
EROs – espécies reativas de oxigênio
et al. – *et alli*

EUA – Estados Unidos da América
eV – elétron-volt
F20 – vigésima geração
FTIR – Espectroscopia Infravermelho Transformada de Fourier
g/mol – gramas por mol
GO – óxido de grafeno
H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HRP – *Horseradish peroxidase*
I – intensidade de luz
i.m. – intramuscular

i.p. – intraperitoneal

i.v. – intravesical

ISUP – Sociedade Internacional de Patologistas e Urologistas

IV – infravermelho

kDA - kilodalton

KEAP- proteína proteassomal independete de ubiquitina

LP – lâmina própria

m – metro

Maf – frequência do alelo menor

MBG - materiais a base de grafeno

MEV-FEG – microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

mg/dL – miligramas por decilitro

mL – mililitro

MMAC – *Mutated in Multiple Advanced Cancers*

MNU - N-metil-N-nitrosouréia

mTOR – *mammalian target of rapamycin*

M-VAC - metotrexano, vinblastina, doxorrubicina e cisplatina

NADPH – nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato (estado reduzido), *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NCs - nanocompostos

NF-E2 – fator de transcrição eritróide 2p45 NOX – NADPH oxidase

Ni - níquel

nm - nanometro

Nrf2 – fator de transcrição eritróide 2p45 relacionado ao fator 2, *Nuclear fator (erythroid-derived 2)- like 2*

O - oxigênio

O_2^- - ânion superóxido

O_2 - oxigênio

O-H - hidroxila

OH^- – radical hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – proteína p53

Pak1 – *p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1*

PEG - polietilenoglicol

PEO - polioxietileno

PF - Pluronic®

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase

PIP2- fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato

PIP3 – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PPO - polioxipropileno

proteinase K – *broad-spectrum serine protease*

pT1- tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial

pT2 – tumor que invade o músculo

pT4 – tumor que invade qualquer uma das estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica
pTa – carcinoma papilífero não invasivo
pTEN – fosfatase homóloga de tensina deletada do cromossomo 10
pTis – carcinoma *in situ*
Rac-1 – *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
Ras - oncogene
rGO – óxido de grafeno reduzido
RNA – ácido ribonucleico
RPM – Rotação por Minuto
RTU – ressecção transuretral
SDBS - dodecilbenzenosulfonato de sódio
SDS - dodecilsulfato de sódio
SDSA - dodecilsulfonato de sódio
Si(Li) – silicone- lítio
TBS-T – Tampão tris salino com detergente Tween
TGO – transaminase glutâmica oxalacético
TGP - transaminase glutâmica pirúvica
TNM – Classificação TNM (tumor, linfonodos e metástases)
U/L – unidades por litro
UICC – União Internacional Contra o Câncer
Unicamp – Universidade de Campinas
Ur - ureter
UV-Vis – ultravioleta - visível
XPS – espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio X
XRD – difração de raio X
ʎ - comprimento de onda
α - alfa
β – beta

RESUMO

O câncer de bexiga é a malignidade mais comum do trato urinário. O tratamento mais estipulado atualmente para os casos de câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) é uma ressecção transuretral associada à administração de dose intravesical de manutenção de Bacillus de Calmette-Guerín (BCG). Entretanto, a imunoterapia com BCG também causa efeitos indesejáveis, além de aumentar a taxa de recidiva da doença secundária à interrupção do tratamento. Nesse contexto, o óxido de grafeno (GO) e/ou o óxido de grafeno reduzido (rGO) têm atraído significativo interesse no campo da detecção biológica, *drug delivery* e nas terapias anti-tumorais. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar os efeitos antitumorais da Doxorrubicina (DOXO) e da Cisplatina (CIS) funcionalizadas na dispersão rGO com polímero Pluronic® F-68 frente ao tratamento do CBNMI. Inicialmente, foi realizada a caracterização do composto de rGO para conhecer suas propriedades químicas. Foram utilizadas 30 ratas da variedade Fischer 344, sendo constituído um grupo controle de cinco animais (Grupo 1), os quais receberam 0,3 mL de solução fisiológica à 0,9% por via intraperitoneal (i.p.). Nos demais animais foram administradas doses de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) intravesical (i.v.) e, após quatro doses, foram divididos em cinco grupos: Grupo Câncer (Grupo 2), Grupo Câncer+rGO (Grupo 3), Grupo Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Grupo Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Grupo Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6), os quais receberam respectivamente: mesmo tratamento do Grupo 1; dose 0,2mL na concentração de 0,2mg/mL de rGO; 0,2mL da dispersão rGO com CIS a 0,05mg; 0,2mg de DOXO em 0,2mL da dispersão e 0,2mL da dispersão com as mesmas concentrações de quimioterápicos que os Grupos 4 e 5. Todos os tratamentos foram por via i.p., com administração semanal durante seis semanas consecutivas. Após 16 semanas de tratamento, as bexigas urinárias foram coletadas para análise histopatológica, imunohistoquímica e bioquímica e ainda, colhido sangue para realização de análises bioquímicas quanto às funções hepáticas e renais. Os resultados obtidos da caracterização química do composto comprovou tratar-se de um rGO. Quanto aos resultados da análise histopatológica, notou-se que 80% dos animais do Grupo 2 apresentaram carcinoma com invasão de lâmina própria (pT1). Similarmente nos Grupos 3 e 4, evidenciou-se carcinoma urotelial papilífero de alto grau (pTa), carcinoma in situ (pTis) e pT1 em 60%, 20% e 20% dos animais, respectivamente. O Grupo 5 apresentou 60% de pTis, 20% de pTa e 20% neoplasia intraurotelial de baixo grau. No Grupo 6 observou-se uma melhor

condição histopatológica, com lesões menos severas 40% de hiperplasia plana, 20% neoplasia intraurotelial de baixo grau, 20% pTis e 20% pTa. Na avaliação da toxicidade, identificou que os nanocompostos funcionalizados com quimioterápicos apresentaram baixa toxicidade. Em relação à imunorreatividade NOX 1 e PI3K, notou-se que a mesma foi intensa nos Grupos 2, 3, 4 e 5 quando comparado ao Grupo 6, o qual apresentou moderada imunorreatividade para NOX 1 e fraca para PI3K. Em contraste, nos Grupos 2, 3, 4 e 5 foi evidenciado fraca imunomarcação para PTEN e Nrf2 em relação aos Grupos 1 e 6. Através dos ensaios de FTIR e Raman, constatou-se mudanças estruturais e bioquímicas no tecido diante do processo patológico e do potencial de evolução com a nova terapêutica. Visto que o grau de regressão tumoral foi correlacionado a diminuição de PTEN e NOX 1, bem como ao aumento de PI3K e Nrf2 no Grupo Câncer+rGO+CIS+DOXO, podemos inferir que o rGO possui potencial para ser usado como um sistema carreador de DOXO e CIS em nanoformulações para CBNMI.

Palavras-chave: câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo, óxido de grafeno reduzido, cisplatina, doxorrubicina, intraperitoneal, NOX 1, Nrf2, PI3K, PTEN

ABSTRACT

Bladder cancer is the most common malignancy of the urinary tract. The recommended first-line treatment for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) following transurethral resection, is an induction course plus maintenance with intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). However, BCG immunotherapy causes undesirable effects, which contributes to treatment interruption, increasing cancer index recurrence. In this context, graphene oxide (GO) and/or reduced graphene oxide (rGO) has attracted increasing interest in the field of biological detection, drug delivery and cancer therapies. Thus, the aim of this study was to characterize and to compare the antitumor effects of Doxorubicin (DOXO) and Cisplatin (CIS) functionalized in rGO on dispersion with Pluronic F-68 polymer to the treatment of NMIBC. Initially, the characterization of the compound guarantee its chemical properties. It was used 30 female Fischer 344 rats, consisting a control group of five animals (Group 1), which received 0.3 ml of saline 0.9% intraperitoneally (i.p.). The remaining animals received 1.5 mg/kg of N-methyl-N-Nitrosourea (MNU) intravesical (i.v.) and after four doses, they were divided into five groups: Cancer Group (Group 2), Cancer + rGO Group (Group 3), Cancer + rGO + CIS Group (Group 4), Cancer + rGO + DOXO Group (Group 5), Cancer rGO + CIS + DOXO Group (Group 6), which received, respectively: the same treatment as group 1; received 0.2 mL dose at a concentration of 0.2mg/ml; received 0.2 mL of rGO dispersion with 0.05mg CIS; received 0.2 mg of DOXO in 0.2 mL of the dispersion; received 0.2 mL of rGO dispersion with the same chemotherapy combinations that groups 4 and 5. All treatments were i.p., with weekly administration during six consecutive weeks. After 16 weeks of treatment, urinary bladders were collected for histopathological, immunohistochemical and biochemical analysis, and still, blood collected for performing biochemical analyzes to obtain liver and kidney functions. The results of the chemical characterization of the compound purchased that is an rGO. As for the results of the histopathological evaluation, it was noted that 80% of Group 2 animals showed carcinoma with lamina propria invasion (pT1). Similarly, Groups 3 and 4 revealed a high grade urothelial papillary carcinoma (pTA), carcinoma in situ (pTIS) and pT1 in 60%, 20% and 20% of animals respectively. Group 5 showed 60% of pTIs, 20% of pTA and 20% of intraurotelial low-grade neoplasia. Group 6 shows a better histological condition, with less severity lesions 40% of flat hyperplasia, 20% intraurotelial low-grade neoplasia, 20% pTA and 20% pTIS. In the evaluation of toxicity, we identified that functionalized

nanocomposites with chemotherapy showed low toxicity. In relation to immunoreactivity of NOX 1 and PI3K, we observed that it was intense in Groups 2, 3, 4 and 5 when compared with Group 6, which showed moderate immunoreactivity for NOX 1 and low for PI3K. On the other hand, Groups 2, 3, 4 and 5 evidenced weak immunostaining for Nrf2 and PTEN compared to Groups 1 and 6. By means of FTIR and Raman studies, it was noted structural and biochemical changes in the tissue before the disease process and development potential on the new therapy. Since the degree of tumor regression was correlated to the reduction of PTEN and NOX 1, as well as increase of PI3K and Nrf2 in the Group of Cancer + rGO + CIS + DOXO, it might be said there is a potential of rGO to be used as a carrier system of DOXO and CIS in nanoformulations to NMIBC.

Key-words: non-muscle invasive bladder cancer, reduced graphene oxide, cisplatin, doxorrubicin, intraperitoneally, NOX 1, Nrf2, PI3K, PTEN

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24
2.1 Aspectos Epidemiológicos 24
2.2 Classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer 25
2.3 Modelo experimental de indução do câncer de bexiga não-músculo invasivo 27
2.4 Vias de Sinalização NOX 1, NRF2, PTEN, PI3K 29
2.5 Opções terapêuticas para CBNMI 35
2.5.1 Cisplatina 37
2.5.1 Doxorrubicina 40
2.6 Novas alternativas para o tratamento do CBNMI e a contribuição da nanotecnologia 43
2.6.1 Óxido de grafeno reduzido 45
2.6.2 Funcionalização rGO com Pluronic® F68 48
2.7 Nanotoxicologia 51
2.8 Bexiga urinária e o potencial da via intraperitoneal para liberação sistêmica de fármacos 52
2.9 Metodologias empregadas para avaliar o desempenho da dispersão do nanocarreador de fármacos 55
2.9.1 Síntese e caracterização do óxido de grafeno reduzido 55
2.9.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X 56
2.9.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo 56
2.9.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X 56
2.9.5 Análise de Difração de raio X 57
2.9.6 Espectroscopia de Raman 57
2.9.7 Espectrofotômetro ultravioleta-visível 58
2.9.8 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier 58
3 OBJETIVO 59
3.1 Objetivo Geral 59
3.2 Objetivos Específicos 59
4 MATERIAIS E MÉTODOS 60
4.1 Síntese do óxido de grafeno reduzido 60
4.2 Caracterização do óxido de grafeno reduzido 60
4.2.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X 60
4.2.2 Dispersibilidade do rGO 60
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo 60
4.2.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X 61
4.2.5 Análise de Difração de raio X 61
4.2.6 Espectroscopia de Raman 61

4.2.7 Espectrofotômetro ultravioleta visível 61
4.2.8 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier 61
4.3 Funcionalização rGO em Pluronic® F-68 61
4.4 Adesão da cisplatina e doxorrubicina na dispersão de rGO/PF-68 62
4.5 Aplicações das dispersões de rGO combinadas com os quimioterápicos CIS e DOXO no modelo animal CBNMI 62
4.5.1 Amostra 62
4.5.2 Indução do CBNMI 63
4.5.3 Seleção do Grupo controle e grupos experimentais 63
4.6 Análises Histopatológicas 65
4.7 Testes bioquímicos 65
4.8 Imunomarcação para NOX 1, Nrf2, PI3K e PTEN 66
4.9 Medição de Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier 66
4.10 Medição de Espectroscopia de Raman 67
4.11 Análise Estatística 67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 69
5.1 Caracterização do rGO 69
5.1.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X 69
5.1.2 Dispersibilidade do rGO 69
5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo 70
5.1.4 Espectroscopia de fotoeletrons excitados por raios X 70
5.1.5 Análise da difração de raio-X 71
5.1.6 Espectroscopia de Raman 72
5.1.7 Espectro Ultravioleta –visível 72
5.1.8 Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier 73
5.2 Análises Macroscópicas 74
5.3 Análises Histopatológicas 77
5.4 Testes bioquímicos 80
5.5 Imunomarcação para NOX 1, Nrf2, PI3K, PTEN 83
5.6 Medição do espectro Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) 92
5.7 Medição de Espectroscopia de Raman 98
6 CONCLUSÃO 106
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108
ANEXO 121

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que pode afetar diversas partes do corpo, tendo como característica o crescimento desordenado de células anormais que pode invadir tecidos adjacentes e se espalhar para outros órgãos (WHO, 2014). O câncer é resultante da perda da homeostasia mediada por alterações nas formas de comunicação intra, extra e intercelular as quais desregulam o balanço estabelecido entre a proliferação celular, diferenciação, apoptose e adaptação (Trosko e Ruch, 1998).

Por outro lado, o câncer de bexiga urinária (CB) é considerado a segunda lesão maligna de origem geniturinária e a nona em incidência mundial de câncer (Chiong et al., 2008). Em todo o mundo já foram diagnosticadas 2,7 milhões de pessoas com CB e somente nos EUA estima-se 74.690 casos e 15.580 mortes de CB no ano de 2014. A incidência e a mortalidade expressam-se estáveis ou em declínio desde os anos 90, apresentando uma maior incidência nos EUA e nos países europeus (Yeung et al., 2014). No Brasil calcula-se, para 2014, 8.940 novos casos, sendo 6.750 em homens e 2.190 em mulheres (INCA, 2014).

Vale considerar que o CB em dólares, é a doença mais cara quanto ao tratamento desde o diagnóstico até a morte, isto devido ao longo tempo de sobrevida associada com a doença não-músculo invasiva. De acordo com Yeung et al. (2014), nos EUA estima-se que, em 2010, foram gastos 4,25 bilhões de dólares e espera-se que em 2020 aumente para cinco bilhões de dólares. Chiong et al. (2008) relatam que há 10 anos, a identificação de marcadores na urina é uma forma de manter o custo do tratamento baixo, porém experimentos mostram que é necessário maiores estudos.

É importante ressaltar que CB constitui um desafio, pois esses tumores exibem vias altamente complexas e um comportamento clínico imprevisível (Mhawech-Fauceglia et al., 2006). Sabe-se que o risco para desenvolvimento de múltiplos cânceres após o diagnóstico do tumor primário é de 16% (Hayat et al., 2007).

No caso de neoplasias vesicais, observamos que aproximadamente 95% CB são carcinomas de células uroteliais (Yeung et al., 2014), sendo que a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Contudo, aproximadamente 80% dos pacientes em um curto período de tempo, 5 anos, desenvolverão recorrência tumoral e destes 20-30% apresentarão uma progressão da agressividade de tumores músculo invasivos (Shen et al. 2008; Yeung et al. 2014).

O CB pode apresentar um longo período de latência com determinadas lesões, podendo ocorrer mais de 30 anos após a exposição a um agente cancerígeno, sugerindo que o processo aconteça em duas etapas: a primeira de fixação de uma mutação no DNA e a segunda com promoção e crescimento das células alteradas. Em muitos casos o agente iniciador pode ser o promotor do processo carcinogênico (Newling et al., 1995).

Segundo dados da OMS, estima-se que em 2030 serão diagnosticados 13 milhões de casos de câncer, sendo 70% em países menos favorecidos economicamente, constituindo assim um desafio científico, tecnológico e de inovação com a intensa busca por tratamentos mais eficazes que os atuais através da quimioterapia e radioterapia (WHO, 2014). Neste sentido inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas na terapia contra o câncer, principalmente para superar os casos de resistência de fármacos (Jabir et al., 2012).

A quimioterapia é mais importante para o tratamento de uma grande variedade de cânceres (Zhang et al., 2011b). Os fármacos quimioterápicos para serem eficazes no tratamento contra o câncer, após a administração, devem ser capazes de atingir o tecido tumoral através da passagem pela barreira com o mínimo de perda de volume ou atividade na circulação sanguínea. Após alcançar o tecido tumoral, os fármacos devem ser seletivos, destruindo somente as células tumorais; além disso, devem apresentar um mecanismo de controle de liberação da sua forma ativa. Essas duas estratégias básicas estão associadas a melhorias na sobrevida do paciente e na sua qualidade de vida, pelo simultâneo aumento da concentração celular do fármaco e redução da toxicidade que limita a dose a ser administrada (Prakash et al., 2011).

A nanomedicina, aplicação médica da nanotecnologia, tem um potencial atrativo para revolucionar a terapia contra o câncer e o diagnóstico através do desenvolvimento de nanocompostos biocompatíveis no propósito de *drug delivery*, o que representa a aplicação mais pertinente dos nanocompostos (Prakash et al., 2011).

Por outro lado, ressalta-se que a imunoterapia com Bacillus Calmette-Guérin (BCG) é a forma mais eficaz de terapia intravesical para a profilaxia da recorrência e progressão do câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI). Contudo, a imunoterapia com BCG está frequentemente associada com efeitos adversos locais e/ou sistêmicos, incluindo sepse, além de recorrência tumoral em até 30% dos casos. A incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos é significativamente reduzida com a utilização de agentes quimioterápicos. 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. Apesar disso, até hoje, não há no mercado nenhum outro medicamento mais eficaz que o BCG. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas, são muito relevantes. Nesta linha de raciocínio, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas ou o melhoramento de fármacos já existentes para o tratamento de câncer como o CBNMI.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Epidemiológicos

Estudos epidemiológicos realizados por Talaska et al. (1991) mostraram a relação entre o número de cigarros consumidos, o tipo de fumo utilizado e o aumento do risco de carcinoma urotelial. Neste sentido, Cohen e Johansson (1992) citam que os inúmeros compostos químicos existentes na fumaça do cigarro (hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas, aldeídos insaturados) podem ser relacionados ao carcinoma urotelial.

O tabagismo é capaz de aumentar de três a sete vezes a suscetibilidade para o desenvolvimento do tumor, de acordo com a intensidade do hábito (Pashos et al., 2002). Estudos realizados por Heijiden e Witjes (2009) identificam que fumantes apresentam um elevado risco para desenvolver CB comparado a não fumantes; as mulheres apresentam um risco mais elevado quando fumam a mesma quantidade de cigarro que um homem. Através de estudos de Gontijo et al. (2002) identificou-se que indivíduos tabagistas possuem maior instabilidade genômica nas células uroteliais; estudos de Auerbach e Garfinkel (1989) mencionam que estes indivíduos possuem uma resposta proliferativa alterada no sistema urinário, manifestada pelo desenvolvimento de hiperplasias.

Acredita-se que o tempo de exposição contínua ao tabaco seria o fator de risco preponderante; indivíduos que deixaram de fumar têm uma diminuição gradativa da probabilidade em desenvolver a doença. Embora o risco diminua em 40% após 1-4 anos de abstinência, um ex-fumante ainda apresenta risco aumentado em relação a população em geral, depois de 25 anos (Brennan et al., 2000).

A exposição ocupacional é responsável por aproximadamente 20% dos casos de CB, sendo que trabalhadores das indústrias têxteis, corantes e borracha estão susceptíveis ao contato constante de agentes como: β- naftalina, 4-aminobifenil e benzidina. Ainda pode-se dizer que exposição a arilaminas, uso prolongado de analgésicos do tipo fenacetina e exposição a ciclofosfamida também contribuem para o desenvolvimento da patologia (Berggren et al., 2001). Segundo Kirkali et al. (2005), pacientes com histórico crônico de infecção no sistema urinário devido a ação de nitritos e nitrosaminas das bactérias e/ou dos processos inflamatórios, levam ao aumento da proliferação celular e oferecem maior oportunidade de danos no DNA, caracterizado por apresentar maior

associação com os casos invasivos. Estudos de caso/controle realizados por El-Rifai et al. (2000) associaram o carcinoma urotelial com a infecção por *Schistosoma haematobium*.

Conforme estudos realizados por Shelley et al. (2009), o diagnóstico é mais comum em homens que em mulheres (proporção de 4:1) devido à exposição aos fatores de risco, contudo Kirkali et al. (2005) ressaltam que a sobrevivência relacionada ao estádio parece ser pior entre os indivíduos do sexo feminino. De acordo com Fair et al. (1993) a incidência de muitos tumores sólidos, assim como o CB, constitui uma patologia característica da população idosa e segundo Cohen e Johansson (1992) a incidência aumenta progressivamente com a idade, sendo particularmente alta após os 60 anos.

2.2 Classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer

Com base nos estudos de Epstein et al. (1998), a fim de levar a um consenso das terminologias das lesões de bexiga por patologistas, urologistas e oncologistas, em dezembro de 1988, os membros da OMS e a Sociedade Internacional de Patologistas e Urologistas (ISUP) publicaram no *The World Health Organization/Internacional Society of Urological Urinary Bladder*, documento que abrange a nomenclatura para lesões neoplásicas e pré-neoplásicas. Em conformidade com Greene (2002), o estadiamento é um dos fatores mais importantes na escolha do tratamento e do prognóstico do CB. Conforme mostra Tabela 1, segue a classificação do sistema de estadiamento TNM (tumor, linfonodos e metástases) da União Internacional Contra o Câncer (UICC).

Tabela 2. Classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC), 2002.

Classificação TNM da UICC, 2002
Bexiga
TX – O tumor primário não pode ser avaliado
T0 – Não há evidência de tumor primário
TA – Carcinoma papilífero não invasivo
Tis – Carcinoma *in situ* “tumor plano”
T1 – Tumor que invade o decido conjuntivo sub-epitelial
T2 – Tumor que invade músculo
T2a – Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
T2b - Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3 - Tumor que invade tecido perivesical

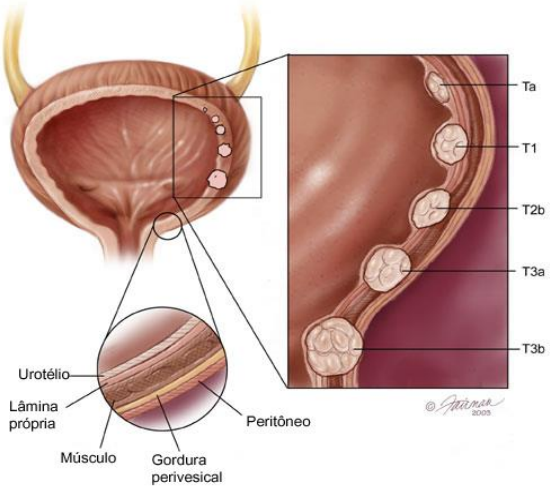
...Cont.

T3a – microscopicamente
T3b – macroscopicamente (massa extravesical)
T4- Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a – Tumor que invade próstata, útero ou vagina
T4b – Tumor que invade parede pélvica ou parede abdominal
N – Linfonodos Regionais
NX – Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0 - Ausência de metástase em linfonodo regional
N1 – Metástase, em um único linfonofo, com 2cm ou menos em sua maior extensão
N2 – Metástase, em um único linfonofo, com mais de 2cm até 5 cm em sua maior dimensão ou em múltiplos linfonodos, nenhum com mais de 5cm em sua mior dimensão
N3 – Metástase em linfonofo com mais de 5cm em sua maior dimensão
M –Metástase à distância
MX – A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0 – Ausência de metástase à distância
M1 – Metástase à distância

Fonte: Epstein et al. (1998).

Segundo Yeung et al. (2014), os casos de CB são divididos de acordo com a severidade da invasão em: tumor não-músculo invasivo (CBNMI) que inclui os estádios de pTis, pTa e pT1 e tumor músculo invasivo de bexiga urinária que inclui os estádios de pT2 a pT4 (Figura 1).

Figura 1: Estádios do câncer de bexiga urinária.



Fonte: http://www.uronline.com.br/wp-ontent/uploads/2013/02/ anatomy_bladdercancer-pt.jpg. Acessado em: 31/12/2014.

DeGraff et al. (2011) relatam que a alteração da barreira do urotélio e o aumento citoplasmático têm sido associados ao aumento da suscetibilidade de mutações neoplásicas levando à perda da diferenciação e ao desenvolvimento do câncer. O CB se desenvolve por discretos caminhos com alterações cromossomais. As lesões podem ser classificadas em: (1) bem diferenciada, papiloma não-invasivo; (2) pouco diferenciada não-músculo invasivas com alterações em genes supressores de tumor e oncogenes; (3) carcinoma *in situ* bem delimitado, não papilomatoso, pouco diferenciado com alterações genéticas de tumores músculo invasivo e papilomas; estes são característicos para o risco de doença invasiva, mostrando a associação entre a perda da diferenciação urotelial e o desenvolvimento do CB agressivo.

2.3 Modelo experimental de indução do câncer de bexiga não-músculo invasivo

O estudo do CB utiliza diversos modelos experimentais; as linhagens celulares uroteliais provenientes de tecido humano, ainda necessitam de validação em modelos *in vivo* (Crallan et al., 2006) enquanto modelos em animais, permitem avaliar novos fármacos com potencial terapêutico, via de administração, farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade (Reis et al., 2009).

Existem inúmeras evidências de que as neoplasias humanas, assim como as induzidas quimicamente em animais de experimentação, ocorrem por meio de um processo de múltiplas etapas, no qual as células se transformam do fenótipo benigno para o maligno (Hanahan e Weinberg, 2000). A evolução morfológica está associada ao

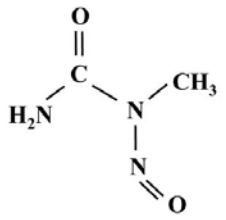
acúmulo de lesões genéticas e cromossômicas que são responsáveis pela progressão da neoplasia (Cohen e Ellwein, 1991).

A utilização de modelos envolvendo roedores é assegurada pela semelhança com CB desenvolvido em humanos (Williams et al., 2008; Reis et al., 2009). Segundo Williams et al. (2008), pode-se dizer que a estrutura e a função do sistema urinário inferior de roedores é semelhante aos humanos e ambos exibem perfis de expressão gênica similares no CB.

Para as alterações neoplásicas serem iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos, são instilados diretamente, na bexiga urinária dos mesmos, carcinógenos químicos em baixas doses e num pequeno espaço de tempo (Crallan et al., 2006).

Estudos de Steinberg et al. (1990) relatam casos utilizando quatro doses de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) para rápida indução do CBNMI em ratos, comprovando que este é um carcinógeno completo (Figura 2). O MNU atua como iniciador e promotor da neoplasia podendo causar persistente metilação do DNA. Além disso, o MNU é o único carcinógeno conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica.

Figura 2: Representação da estrutura química do N-metil-N-nitrosuréia (MNU).



Fonte: http://iv.iiarjournals.org/content/25/1/11.figures-onlyhttp://iv.iiarjournals.org/. Acesso em: 31/12/2014.

O uso do MNU na indução do CB em roedores tem como vantagens o baixo custo, reprodutibilidade e um hospedeiro imunocompetente. A instilação intravesical de MNU em ratos levou a uma melhora na eficiência da indução de CB (Reis et al., 2010).

Posteriormente, este modelo foi modificado e desenvolveu tumores de bexiga urinária semelhantes clinicamente aos observados em humanos, os quais tiveram origem exclusiva no urotélio; foram espontâneos e histologicamente equivalentes ao carcinoma de células uroteliais, sendo um importante modelo para o estudo do CBNMI (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2010).

Segundo Oliveira et al. (2006), na indução em roedores para carcinogênese urotelial ocorre uma sequência de alterações morfológicas: inicia-se com hiperplasia

simples que progride para hiperplasia nodular e papilar. De acordo com Cohen (2002), esta evolui para graus progressivos de displasia, papilomas, carcinomas não-músculo invasivos e músculo invasivos.

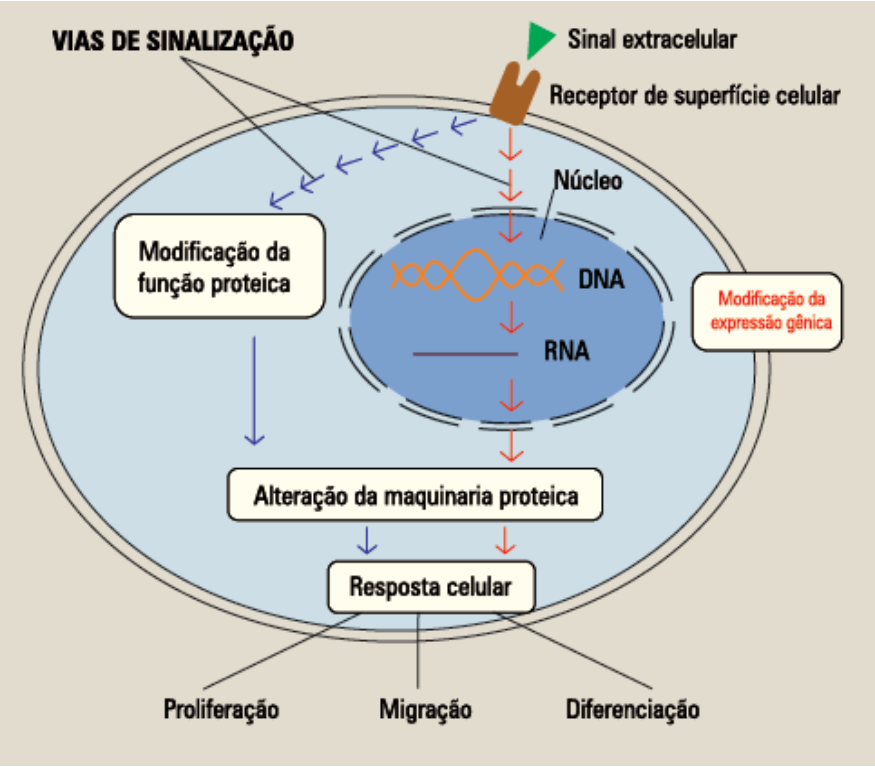
A linhagem Fischer 344 de animais isogênicos é a mais utilizada nos estudos de neoplasias e toxicologia por apresentarem boa resposta a compostos químicos e alta susceptibilidade às ações carcinogênicas do MNU. No estudo de Reis et al. (2010), os animais apresentaram uma sobrevida média de 24 meses em 87% dos animais avaliados em ambos os sexos.

Com base nas pesquisas de Billingham e Silvers (1959) entende-se que animais isogênicos são obtidos do acasalamento de irmão com irmã por vinte ou mais gerações consecutivas (F20), de forma que possam ser atribuídos a um único ancestral em pelo menos 20 gerações, não dependente de teste genético. Estes apresenta uma incidência de homozigose em qualquer *locus* gênico superior a 98% e histocompatíveis entre si, podendo ser transplantados sem rejeição imunológica. Deste modo, no estudo do CB, uma menor quantidade de animais é necessária para detectar diferenças entre os grupos estudados.

2.4 Vias de Sinalização NOX 1, NRF2, PTEN, PI3K

Os organismos pluricelulares complexos são formados por um conjunto de tecidos, os quais são constituídos de células especializadas desempenhando funções específicas de maneira coordenada. A coordenação celular só é possível através de moléculas-sinal secretadas ou expostas na superfície, denominadas de sinalização celular (Figura 3). As moléculas-sinal são reconhecidas por receptores, geralmente proteínas, que transmitem a informação no mecanismo da transdução de sinal através da via de sinalização, regulando eventos fisiológicos como proliferação, migração, diferenciação celular, entre outros. Esse mecanismo pode levar a alteração da função da proteína (resposta rápida e passageira) ou causar modificação gênica, alterando a quantidade de proteína dentro da célula (resposta lenta e prolongada), acarretando mudanças no comportamento celular (Souza et al., 2014).

Figura 3: Transdução de sinais. O estímulo de um receptor de superfície celular por sinal extracelular desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, transferindo informações que promovem a resposta celular



Fonte: Souza et al. (2014).

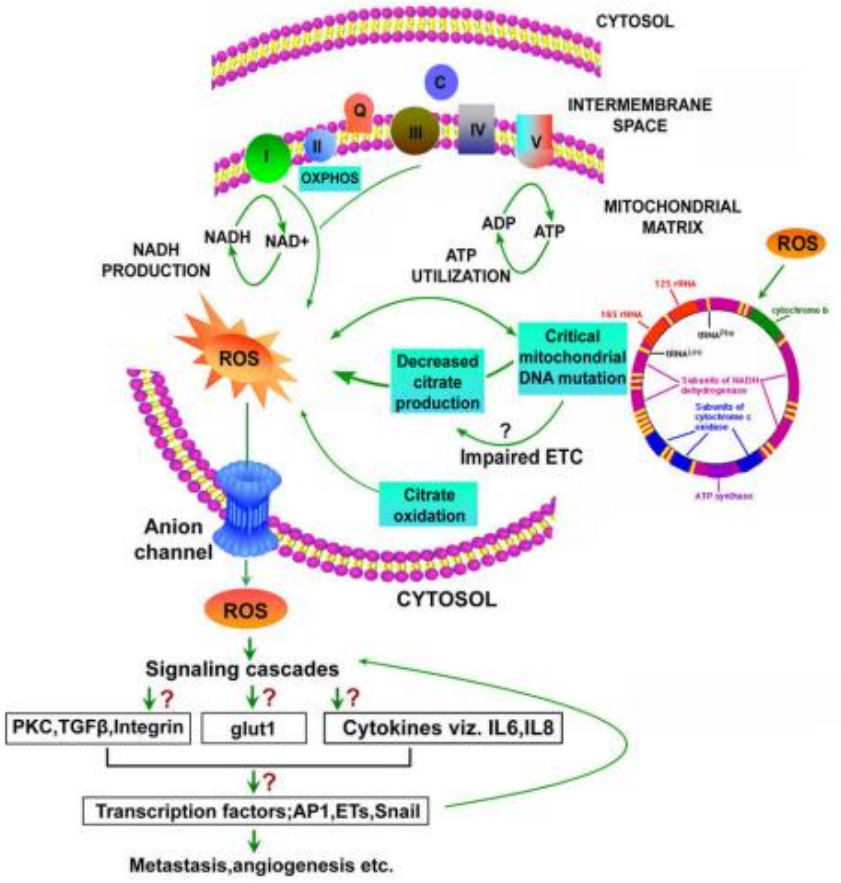
Durante o processo neoplásico vários eventos celulares podem ser desregulados, como o aumento do crescimento, proliferação, resistência a apoptose, instabilidade genômica e mutações no DNA. A desregulação é reflexo de alteração na atividade ou expressão de proteínas das vias de sinalização (Hanahan e Weinberg, 2011).

A incidência de doenças relacionadas a processos cancerígenos envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou radicais livres, vem merecendo especial atenção nos últimos anos (Ichimura et al., 2004; Bayraktar et al., 2010). Segundo Elsbach e Weiss (1983), EROs são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron não-pareado no orbital mais externo. Conforme relatos de Brown-Borg et al. (1999), essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares: proteínas, DNA e lipídios.

De acordo com Huang et al. (2012), EROs são subprodutos inevitáveis da respiração aeróbica de mamíferos, e podem ser encontradas em muitos processos patológicos, envelhecimento, mutagênese e carcinogênese. Conforme Reuter et al. (2010), quando produzidas por um longo período, podem levar a danos na estrutura e

funções das células, induzindo a mutações somáticas e transformação neoplásica. A produção de EROs modula a resposta imune, sendo um regulador importante da função celular (Kabe et al., 2005). EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (Eblin et al., 2008) (Figura 4).

Figura 4: Via de sinalização EROS e Nrf2.



Fonte: Kandrika et al. (2009).

As enzimas nicotinamida (NADPH) oxidases (NOX) são as principais fontes de EROs na forma de O_2^- celular (Segal e Shatwell, 1997; Shimada et al., 2011). Essas enzimas oxidases podem ser simples ou duplas (Kabe et al., 2005; Shimada et al., 2011). Estudos realizados por Brandes et al. (2014) apontam que no genoma humano existem sete homólogos de NOX: NOX1 a NOX5, DUOX1 e DUOX2, as quais diferem no nível de expressão específica de cada órgão, no tipo de EROs inicial, no controle da EROs aguda e na associação da transdução de sinal.

De acordo com Maghzal et al. (2012), cada integrante da família NOX possui padrão específico de expressão tecidual e de regulação, funcionando como transportador

de elétrons transmembrana usando cadeias citosólicas de fosfato de dinucleotídeo de adenina e NADPH como doadores de elétrons de oxigênio no ambiente extracelular ou próximo à célula. O mecanismo dos integrantes da família NOX geram O_2 como produto primário.

Os mesmos autores afirmam que a atividade é regulada por proteínas de membrana e citosólicas, sendo que as EROs derivadas de NOX são afetadas por diferentes enzimas antioxidantes, como catalase e glutationa peroxidase. Segundo Kabe et al. (2005) e Shimada et al. (2011) as baixas concentrações de EROs geradas por elas atuam como mediadores da apoptose, inflamação, crescimento celular e angiogênese em vários tipos de cânceres humanos.

Muitos estudos relacionam a família NOX com um aumento da geração de EROs em diversos tipos de câncer, sendo que NOX 1 é altamente expresso nos cânceres de cólon, gástrico, próstata e bexiga (Huang et al., 2012).

Khandrika et al. (2009) e Shimada et al. (2011) apontam que NOX é dismutada para formar H_2O_2, sendo que elevadas quantidades de H_2O_2 são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumoral. Shimada et al. (2009) identificaram que a geração de H_2O_2 por NOX1 desempenhou um importante papel na progressão do CBNMI, mas não nos estádios iniciais da carcinogênese ou sobrevivência da célula cancerosa urotelial.

Outro fator importante na progressão do CBNMI é o fator de transcrição eritróide 2p45 (NF-E2), relacionado ao fator 2 (Nrf2) o qual foi identificado como chave na expressão induzida de enzimas, como a glutationa S-transferase e NADPH, os quais catalisam eliminando eletrófilos oxidativos (Tripathi e Jena, 2010; Slocum e Kensler, 2011; Wakabayashi et al., 2014). Esses aumentam o reconhecimento, reparação ou remoção de danos nas macromoléculas devido à idade e promovem a regeneração dos tecidos após agressões tóxicas (Wakabayashi et al., 2014), removendo eletrófilos reativos que contribuem para a formação de mutações e desenvolvimento do câncer (Tripathi e Jena, 2010; Slocum e Kensler, 2011). Segundo Wakabayashi et al. (2014), a indução de respostas à sobrevivência no interior da célula ocorre por meio da indução de 200 genes.

O Nrf2 é amplamente expresso em tecidos humanos, desempenhando papel na: (1) diminuição dos danos inflamatórios no tecido através da neutralização da geração dos EROs e danos subsequentes macromoleculares, protegendo a célula da carcinogênese (Paonessa et al., 2009; Kim et al., 2010; Slocum e Kensler, 2011); (2) desintoxicação de agentes quimiopreventivos (Iida et al., 2004; Slocum e Kensler, 2011); (3) proteção da

célula cancerígena do estresse celular, aumentando a sobrevivência; (4) ativação da expressão de enzimas citoprotetoras e (5) resistência a vários fármacos associados a proteínas, restaurando a sensibilidade a danos oxidativos e a quimioterapia (Kim et al., 2010).

Estudos indicam que os indivíduos deficientes em enzimas de Fase 2 estão mais propensos a desenvolverem câncer (Paonessa et al., 2009). As enzimas de Fase 2, como as glutationas S-transferases e N-acetil-transferases, estão envolvidas na ativação e destoxificação de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos (Colombo e Rahal, 2008). Assim, a expressão forçada de enzimas de Fase 2, por meio da transecção do gene, protege contra carcinógenos induzidos por danos no DNA e outras citotoxicidades (Paonessa et al., 2009), através da interação com outros genes, influenciando no repovoamento e regeneração (Wakabayashi et al., 2014).

Em condições basais, o Nrf2 está localizado no citoplasma; quando ocorre alteração no ciclo redox, o Nrf2 transloca-se para o núcleo e ativa ARE (*antioxidant response elemento)*, elemento de resposta antioxidante. O Nrf2 é um antioxidante modulado envolvido no metabolismo de enzimas xenobióticas que pode proteger contra agentes oxidantes e eletrofilicos, contribuindo na atividade anti tumoral (Reszka et al., 2014).

A formação de complexos heterodiméricos do Nrf2 e Maf (frequência do alelo menor) regulam a expressão de Nrf2 com genes através de ligação com ARE, atuando como potenciadores e promotores de gene. Em condições basais, o *turnover* metabólico de Nrf2 é rápido, permitindo que o recém sintetizado passe para o núcleo onde os genes alvo são expressos através da formação de complexo de transcriptase funcional de ARE-Nrf2-Maf-polimeraseII na cromatina. A sinalização de NRF2-ARE aumenta a susceptibilidade de danos seguido por uma exposição a toxina (Wakabayashi et al., 2014) (Figura 4).

Uma das principais vias de sinalização intracelular, responsáveis por promover a sobrevivência celular e proliferação, é iniciada pela enzima PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), (Steck et al., 1997; Puzio-Kuter et al., 2009), que é ativada por receptores tirosina-quinases ou por receptores acoplados à proteína G. A presença de PTEN (fosfatase e tensina homóloga deletada do cromossomo 10) no núcleo e no citoplasma, pode agir como um regulador chave para a sobrevivência celular, atuando como supressor tumoral (Ji-Hyun e Charis, 2005).

Os proto-oncogenes são genes que desempenham importante atividade em processos celulares normais como a regulação da expressão gênica ou do crescimento celular e a transdução de sinais citoplasmáticos. Quando alterados por mutação de ponto, amplificação ou por translocação, geram os chamados oncogenes, que apresentam fenótipo maligno por super expressar o produto gênico normal ou proteína com função alterada, significando "ganho" de função, constituindo um evento "positivo" (Baylin e Ohm, 2006).

Em contraste, os genes supressores de tumor estão envolvidos no crescimento celular; ao interromperem a continuidade do ciclo de divisão, inibem a expressão do fenótipo tumorigênico. Assim a inativação ou perda dos produtos dos genes supressores de tumor remove a barreira de proliferação normal o que pode resultar na transformação maligna das células caracterizando um evento "negativo" (Luczak e Jagodzinski, 2006).

A proteína PTEN, conhecida também como MMAC1 (*Mutated in Multiple Andavced Cancers*) está localizada no cromossomo 10q23, sendo uma fosfatase lipoprotéica com atuação no ciclo celular, na apoptose, regulação da adesão celular, migração e diferenciação, e é capaz de desfosforilar resíduos de tirosina e serina devido sua especificidade (Di Cristofano e Pandolfi, 2000).

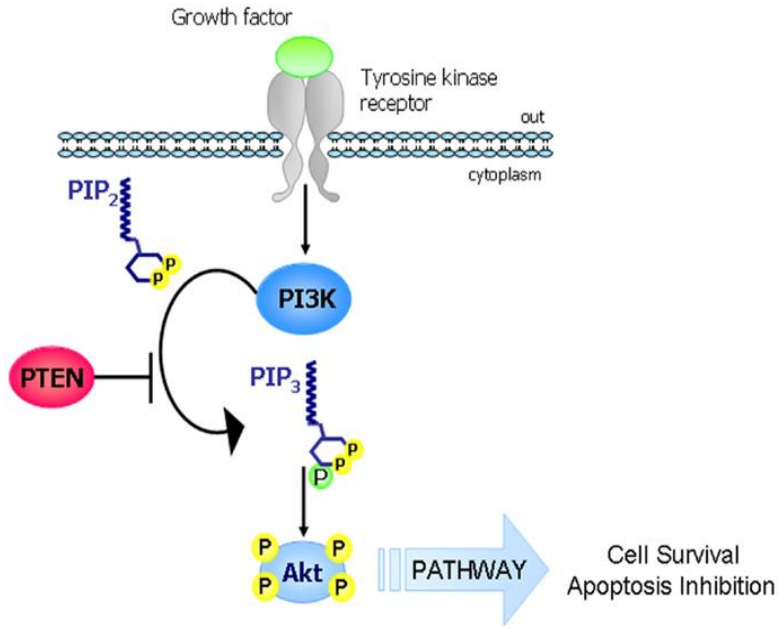
Atuando como supressor tumoral, a PTEN desfosforila a posição 3 de fosfatidilinositídeos como ocorre com a PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), seu principal substrato presente na membrana celular, onde a desfosforilação ocorre na posição 3 de inositol, produzindo a PIP2 (fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato) (Steck et al., 1997; Oki et al., 2005; Puzio-Kuter et al., 2009).

De acordo com Ji-Hyun e Charis (2005), a PIP3, localizada 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 chave para a sobrevivência celular. Kohn e Pommier (2005) afirmam que por meio da desfosforilação de PIP3, PTEN antagoniza as atividades de PI3K e de Akt (gene homólogo ao oncogenes viral v-Akt), que podem atuar como oncogenes por promoverem a sobrevivência celular.

Evidências sugerem que quando PTEN é mutada e/ou inativada ocorre aumento da concentração de PIP3 (Di Cristofano e Pandolfi, 2000), sendo a via de sinalização de PI3K ativada (Di Cristofano e Pandolfi, 2000; Neri et al., 2002). A mutação em PTEN está frequentemente associada ao fenótipo de agressividade metastática do tumor (Di Cristofano e Pandolfi, 2000). A PTEN também exerce importante função na regulação da

atividade do gene p53, uma vez que a ausência de PTEN funcional resulta na perda da atividade de p53 e na inabilidade das células neoplásicas em responder a danos em seu DNA através da indução de reparo ou apoptose (Freeman et al., 2003; Kohn e Pommier, 2005; Oki et al., 2005) (Figura 5).

Figura 5: Via de sinalização de PTEN e PI3K.



Fonte: http://www.frontiersin.org/files/Articles/67693/fonc-03-00326-HTML/image_m/fonc-03-00326-g002.jpg. Acessado em: 31/12/2014.

2.5 Opções terapêuticas para CBNMI

O tratamento convencional para pacientes com CBNMI é a cirurgia de ressecção transuretral (RTU) do tumor e uma terapia adjuvante através de imunoterapia intravesical com "Bacillus Calmette-Guérin" (BCG) ou quimioterapia com mitomicina C, paclitaxel, cisplatina ou doxorrubicina (Shen et al., 2008; Yeung et al., 2014).

A terapia padrão de RTU geralmente é seguida por uma única instilação de agente quimioterápico, sendo que nos estádios de pTa e pT1 é indicado uma nova RTU. A imunoterapia com BCG é o tratamento mais indicado para pTis, reduzindo a taxa de recorrência e progressão da doença quando administrado após a RTU (Weintraub et al., 2014).

Estes mesmos autores relatam ainda que os protocolos de administração do BCG podem variar, sendo mais empregado o estudo do grupo *Southwest Oncology Group* (Swog); este está baseado na administração de uma dose de indução por seis semanas

seguidas, doses múltiplas de manutenção a cada três semanas por três meses e posteriormente a cada seis meses por três anos seguintes à RTU.

Estudos realizados por Schamhart et al. (2000) apontam que após a instilação de BCG, a parede vesical envolta por linfócitos e granulócitos, levam a resposta imune de longa duração que pode persistir por mais de um ano e varia de indivíduo para indivíduo.

Entretanto, a utilização do BCG está associada aos efeitos colaterais variando desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave, o que contribui para a interrupção do tratamento. Somam-se aos efeitos colaterais as falhas ao BCG (cerca de 20% a 40%), que podem ocorrer em intervalos variáveis de tratamento (O'Donnell e Boehle, 2006). De acordo com estudos de Semenza (2003), 35% dos pacientes irão responder a um segundo ciclo de BCG e vão depender de uma terapia alternativa.

Segundo Mitsui et al. (2012), o protocolo terapêutico para pacientes que necessitam de terapia alternativa, possuem CB não ressectável ou ainda metastático envolve os medicamentos metotrexano, vinblastina, doxorrubicina e cisplatina (M-VAC). Até recentemente, este protocolo foi considerado padrão ouro, mas estudos não têm demosntrado ser tão eficaz como se esperava, com menos de 5% dos pacientes com sobrevida livre da doença a longo prazo. Ainda existem os casos de pacientes que mostraram resistência ou recorrência após a quimioterapia de primeira linha passando a não apresentar um padrão terapêutico estabelecido.

Os mesmos autores ainda mencionam que os resultados da terapia com M-VAC melhoram a taxa de sobrevivência para três anos em 20-25% dos pacientes que anteriormente possuiam um tempo médio de sobrevida de 13 meses. Entretanto, há uma preocupação devido sua alta incidência de efeitos adversos, considerando que a maioria dos pacientes são idosos propensos a ter complicações potenciais à quimioterapia.

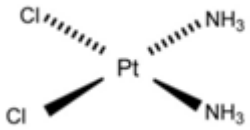
As terapias atuais para o tratamento do câncer podem ser classificadas em dois grupos: terapias citotóxicas (compostos baseados em platina) e terapia com fármacos alvo moleculares. As células cancerosas são mais abundantemente encontradas na fase mitótica em estado de constante replicação do DNA, permitindo uma radiação mais tóxica para as células tumorais do que para as normais, formando uma janela terapêutica (Prakash et al., 2011).

2.5.1 Cisplatina

Alguns metais são essenciais para processos celulares, influenciando em processos bioquímicos celulares como as atividades antioxidantes. A disponibilidade intracelular dos metais é controlada, sendo que em concentrações anormais estão associados a patologias que incluem o câncer. O uso de metais como candidatos a quimioterápicos é evidente, caso da cisplatina [Cis-diamino-dicloro-platina (II)] (CIS) amplamente utilizada e considerada um dos mais potentes. Em 1845, a CIS foi sintetizada pela primeira vez e em 1893, Alfred Werner deduziu a estrutura química da mesma. A partir de 1960, a descoberta da CIS despertou o interesse pela platina e outros compostos contendo metais, quando deu-se o iniciou de uma nova era no tratamento do câncer (Florea e Büsselberg, 2011).

Segundo Huang et al. (2012), a estrutura da CIS consiste em duas aminas ligadas permanentemente e dois ligantes instáveis de cloro (Figura 6). De acordo com Florea e Büsselberg (2011); Dasari e Tchounwou (2014), os cloros podem ser substituídos por água formando espécies aquosas que reagem com nucleófilos.

Figura 6: Estrutura química da cisplatina.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cisplatina.
Acesso em: 20/12/2014.

Na década de 1960, Rosenberg e colaboradores descobriram que a eletrólise de um eletrodo de platina resultava na produção de CIS; posteriormente o mesmo grupo testou com sucesso os efeitos de diversos complexos de platina em sarcomas de rato. Em 1971, a CIS foi aplicada pela primeira vez em pacientes com câncer. Em 1978, tornou-se disponível para clínica como Platinol® (Bristol-Myers Squibb) (Florea e Büsselberg, 2011), e, segundo Dasari e Tchounwou (2014) foi utilizado para o tratamento sistêmico de células cancerosas germinativas.

O interesse por fármacos anticancerígenos à base de metais aumentou desde a descoberta da atividade biológica da CIS para o tratamento de tumores sólidos (Zhang et al., 2012).

Em conformidade com Dasari e Tchounwou (2014), os primeiros estudos da CIS mostraram atividade antitumoral preferencial do isômero cis sobre trans, devido a seus efeitos isotéricos de bases nas ligações de DNA através de uma ligação covalente,

desencadeando o efeito citotóxico. A orientação do isômero cis permite que duas bases de guanina adjacentes na mesma cadeia resultem numa maior torção na hélice de DNA. A CIS ainda pode se ligar a outros componentes celulares, resultando na desativação do fármaco e/ou perturbações das vias bioquímicas normais nas ligações envolvendo CIS e grupos sulfídricos em proteínas, e átomos de nitrogênio em ácidos nucléicos.

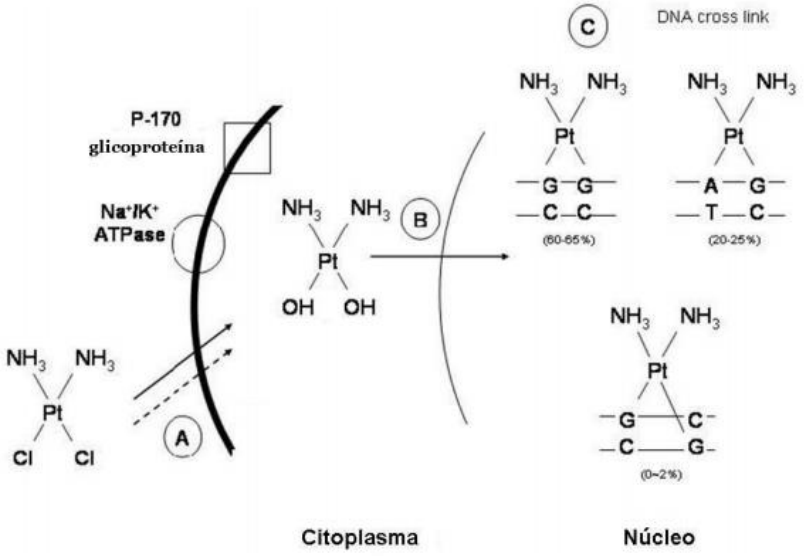
Para Stewart (2007), a CIS ligada a proteínas é menos tóxica quando na forma livre, levando a uma captação reduzida nas células e tecidos; no plasma, se liga irreversivelmente e apresenta meia vida de duas horas. Essa captação não é saturável com a dose, mas é alterada com inibidores metabólicos. Como relatado por Florea e Büsselberg, (2011), a CIS entra na célula por mecanismo passivo e transporte ativo, mostrando que diferentes mecanismos de fixação e de efluxo estão envolvidos, o que pode ser responsável pela reduzida acumulação do fármaco em células resistentes.

Sio et al. (2014) enfatizam que a quimioterapia baseada em platina é o atual padrão ouro de tratamento nos casos avançados e metastáticos de câncer, com uma sobrevida média de um ano.

De acordo com Dasari e Tchounwou (2014), os mecanismos moleculares de ação da CIS podem ocorrer através da: (1) indução do estresse oxidativo caracterizada pela EROs e peroxidação lipídica; (2) indução da sinalização p53 e (3) interrupção do ciclo celular por proteínas anti-apoptóticas, através da ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose e da regulação negativa de proto-oncogenes. Esses mecanismos mostram a necessidade de estratégias combinatórias que podem oferecer melhora significativa na prevenção clínica, levando à redução do consumo da CIS e da inflamação.

Ao se ligar às nucleobases do DNA e clivar a molécula de DNA hidroliticamente ou oxidativamente, a célula sofre apoptose. Quando o dano do DNA for irreparável ou os fatores de transcrição do ciclo celular forem bloqueados, a CIS forma um aducto Platina-DNA na posição N7 da guanina, originando ligações cruzadas intracadeias 1,2-d(GpG) e 1,2-d(ApG) e ligações intercadeias, ativando proteínas em resposta ao dano. Estas proteínas, por sua vez inibem a quinase dependente de ciclina (CDK) promovendo apoptose das células via p53 (Chakraborty et al., 2010). A p53 pode controlar a morte celular induzida por CIS por vários mecanismos, até mesmo através da expressão de PTEN (Dasari e Tchounwou, 2014) (Figura 7).

Figura 7: Via de ação da cisplatina na célula. A- entrando na célula; B- no citoplasma, C- no núcleo.



Fonte: Guminsk (2002).

Os mesmos autores identificam ainda que a CIS também induz a formação de EROs que, quando em excesso, provocam apoptose das células, e pode ocorrer por meios intrínsecos e extrínsecos, por autofagia ou por danos no DNA. A morte celular pode ocorrer após ativação de numerosas vias de sinalização das células cancerosas. Florea e Büsselberg (2011) afirmam que a formação das EROs depende da concentração de CIS e do tempo de exposição. Ao induzir a formação *in vivo,* desencadeiam efeitos colaterais graves como nefrotoxicidade e hepatoxicidade, que são reduzidas pela adição de antioxidantes.

A citotoxicidade da CIS é mais intensa durante a redução da metilação da histona e a condensação da cromatina, ocorrendo um aumento na interação com DNA no ciclo mitótico, desencadeando maior formação do aducto e melhorando a eficácia do fármaco. Ainda pode-se afirmar que a CIS é mais eficiente em pH baixo (Stewart, 2007).

Segundo Cheng et al. (2013), as aplicações terapêuticas da CIS têm restrição devido a: (1) sua tendência de ser alvo tanto nas células tumorais quanto nas saudáveis; (2) instabilidade química; (3) baixa solubilidade em água e (4) baixa lipofilicidade.

Os efeitos colaterais da terapia com platina incluem: náusea, vômito, mielossupressão, imunossupressão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade e perda auditiva em crianças (Florea e Büsselberg, 2011). A CIS é conhecida por sua nefrotoxicidade, tendo a sua dose ajustada pelo *clearence* de creatina e futura falência renal (Sio et al., 2014).

Os pacientes que recebem a CIS como tratamento apresentam efeitos secundários graves que limitam a dose administrada. Considerando que a toxicidade relacionada à CIS é dose dependente, uma sobredosagem pode significar um aumento da morbidade e/ou mortalidade, enquanto a incidência de overdose permanece desconhecida. Assim, deve ocorrer um gerenciamento dessa toxicidade induzida para garantir o sucesso da quimioterapia (Florea e Büsselberg, 2011).

O mesmo estudo aponta ainda um aumento nos níveis de proteínas de reparação de DNA quando as células cancerosas se tornam resistentes ao tratamento com CIS, sugerindo que o mecanismo de reparo deve ser ativado no início da resistência ao fármaco; com o tempo a diminuição da acumulação intracelular e a captura de CIS por macromoléculas que contém grupos sulfídricos podem tornar significativas.

De acordo com Dasari e Tchounwou (2004), os mecanismos de resistência intrínseca das células tumorais podem se desenvolver através de: (1) alteração na captação celular e efluxo da CIS; (2) aumento da biotransformação e desintoxicação do fígado; (3) aumento no reparo do DNA e (4) mecanismos anti-apoptóticos.

Devido à resistência e aos efeitos colaterais tem-se usado uma terapia de combinação da CIS com outros fármacos, como o uso da doxorrubicina, a qual tem sido ser bem tolerado nos pacientes. A taxa de resposta é alta porém, após uma recidiva do tratamento pode ocorrer resistência à CIS. Segundo Cheng et al. (2013), a fim de diminuir essas limitações e melhorar a eficácia terapêutica, a CIS pode ser unida a polímeros hidrofílicos, lipossomos ou micelas.

2.5.1 Doxorrubicina

O hidrocloreto de doxorrubicina ou adrimicina (DOXO) pertence à família das antraciclinas e é um dos quimioterápicos mais eficazes já desenvolvidos. Foi isolado pela primeira vez no início dos anos 1960 a partir da bactéria *Streptomyces peucetis* var. *Caesius* (Takemura e Fujiwara, 2007).

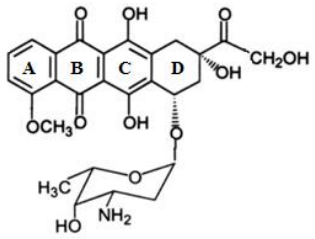
A DOXO é indicada no tratamento de vários tipos de câncer, tais como leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma de células transicionais de bexiga urinária, carcinoma de mama, neuroblastoma, tumor de Wilms, carcinoma ovariano, carcinoma tireóideo, carcinoma prostático, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, sarcoma de Ewing (Medline Plus, 2014).

Segundo Takemura e Fujiwara (2007), os mecanismos de ação da DOXO podem ocorrer através de: (1) intercalação na cadeia de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; (2) formação de EROs causando danos ao DNA ou peroxidação lipídica; (3) ligação e alquilação do DNA; (4) ligação cruzada do DNA; (5) interferência no DNA levando à separação das fitas duplas; (6) efeito direto na membrana; (7) lesões no DNA através da inibição da topoisomerase II; (8) indução da apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II.

Estudos realizados por Mussi et al. (2012) apontam que a DOXO é um fármaco anticancerígeno de largo espectro e anfifílico. Sua baixa penetração e limitada distribuição em tumores sólidos são as principais causas de falha como agente terapêutico. O meio extracelular tumoral apresenta pH baixo e, consequentemente, os fármacos fracamente básicos, como no caso da DOXO, tornam-se protonados ocorrendo diminuição da absorção celular.

O estresse oxidativo induzido pela DOXO é explicado por sua estrutura química, a qual é sujeita de levar a formação de EROs. É uma glicona constituída por um anel tetracíclico com grupos adjacentes de quinona e hidroquinona nos aneis B-C, um substituinte em C-4 do anel D e uma cadeia lateral curta na posição C-9, com grupo carbonila em C-13. A Figura 8 mostra a estrutura da DOXO, sendo que a cadeia lateral termina com um álcool primário responsável pela atividade no tratamento do câncer (Takemura e Fujiwara, 2007).

Figura 8: Estrutura química da doxorrubicina.



Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info .php?term=Doxorrubicina&lang=3. Acesso em: 20/12/2014.

Em estudos realizados por Mizutani et al. (2005), a principal via apoptótica de fármacos quimioterápicos ocorre através da perda da integridade da membrana mitocondrial devido um aumento súbito na sua permeabilidade, conhecida como permeabilidade mitocondrial de transição. O ciclo redox da DOXO pode levar a formação do peróxido de hidrogênio intracelular, devido à presença de resíduos de quinona e hidroquinona, o que pode acarretar danos no DNA.

Atualmente, a DOXO pode ser administrada por via intravenosa na concentração de 2,0 mg/mL ou por via intravesical na concentração de 1,0 mg/mL. A via de administração intravesical é utilizada no tratamento de carcinoma monocítico, tumores papilares da bexiga urinária e carcinoma *in situ* para reduzir recidivas após RTU. Entretanto, a sua administração pela via intravesical, apesar de diminuir os efeitos adversos deste fármaco comparada à administração intravenosa, apresenta baixa eficácia, sendo observado recidiva tumoral em 80% dos casos (Subedi et al., 2009).

Com base em Wientjes et al. (1996) esta baixa eficácia pode estar associada ao seu tempo reduzido de permanência na bexiga urinária devido ao esvaziamento e preenchimento periódico da urina e à baixa permeabilidade deste fármaco ao urotélio. Estas características foram notadas no estudo com administração intravesical de DOXO em pacientes antes da cirurgia de cistectomia radical. Foi observado que mais de 83% deste fármaco administrado foi eliminado após duas horas pela urina e foram detectadas baixas concentrações no urotélio indicando que este age como uma barreira para absorção de fármacos. Além disso, a concentração de DOXO em camadas mais profundas do urotélio reduziu a 50% da concentração em profundidades de 500μm de urotélio, indicando uma baixa penetração da DOXO no urotélio.

O sucesso da DOXO tem sido dificultado devido a seus efeitos deletérios: a sua toxicidade na supressão hematopoética, efeito tais como náusea, vômito, necrose tecidual, alopecia e cardiotoxicidade. Esta pode aparecer de 10 a 15 anos após a interrupção da quimioterapia, sendo o maior impacto observado nos sobreviventes de câncer pediátrico, dos quais 60% receberam como tratamento uma antraciclina e desses 10% desenvolveram uma cardiomiopatia (Octavia et al., 2012).

Os mesmos autores ainda relatam que a cardiotoxicidade pode variar desde alterações em eletrocardiograma assintomáticos até pericardite e cardiomiopatia descompensada. As mulheres apresentam uma cardiotoxicidade mais grave com diminuição da contratilidade da musculatura cardíaca. Idosos com mais de 65 anos e crianças com menos de quatro anos apresentam maior risco à cardiotoxicidade mais severa. Condições crônicas como hipertensão arterial, diabetes melitus, hepatopatia e doença cardíaca prévias aumentam o risco de cardiotoxicidade. Estudos relatados por Takemura e Fujiwara (2007) apontam que a insuficiência cardíaca congestiva adquirida é refratária aos medicamentos comuns.

Segundo os mesmos autores a DOXO apresenta efeitos agudos (11% dos casos), geralmente reversíveis e clinicamnete manejáveis, e crônicos (1,7%, com mortalidade

supeior a 50%), são cardiomiopatias irreversíveis que levam a insuficiência cardíaca, congestiva sobre o sistema cardiovascular. A cardiotoxicidade está relacionada à dose cumulativa total administrada, aos níveis agudos de pico, à idade de exposição e à administração associada a outros antineoplásicos cardiotóxicos concomitantemente. As manifestções clínicas incluem cansaço, taquicardia sinusal, taquipnéia, hipertrofia cardíaca, edema, hepatomegalia e pleurisia. O início da cardiomiopatia ocorre em média após 34 dias da última administração da DOXO.

Disso decorre que a cardiomiopatia induzida pela DOXO é uma preocupação de saúde pública pelo fato de não ser detectada por muitos anos e ser uma contínua ameaça ao longo da vida, sendo de suma importância a administração em crianças que podem sobreviver por décadas após um tratamento antineoplásico bem sucedido. Ressalta-se que a vigilância dos pacientes tratados com antraciclinas deve ser prorrogada por mais de 10 anos para definir o real impacto das antracilcinas no miocárdio, especialmente quando estes pacientes receberam simultaneamente outros fármacos que podem induzir ao dano cardíaco (Octavia et al., 2012).

Assim, a DOXO é considerada um antineoplásico altamente efetivo, porém observa-se severos efeitos adversos. A fim de reduzir esses efeitos indesejáveis sem reduzir a eficácia do fármaco, a DOXO é usualmente encapsulada em veículos carreadores de fármacos (Wu et al., 2013).

Nos últimos anos, o melhoramento de compostos antitumorais tem representado uma área de pesquisa com expectativas para terapias mais específicas e menos tóxicas (Filomeni et al., 2007).

2.6 Novas alternativas para o tratamento do CBNMI e a contribuição da nanotecnologia

A quimioterapia é importante para o tratamento de uma variedade de cânceres (Zhang et al., 2011b). A seletividade para as células tumorais e liberação controlada da sua forma ativa estão associadas a melhorias na sobrevida do paciente e na sua qualidade de vida (Prakash et al., 2011).

A diversidade clínica e a resistência terapêutica das células tumorais é explicada por sua complexidade genética e fenotípica (Yokota, 2000; Jabir et al., 2012), envolvendo principalmente os proto-oncogenes, que são os genes responsáveis pelo controle da

divisão e diferenciação celular, e os genes supressores tumorais, responsáveis por limitar o crescimento celular (Weinberg, 1991).

De acordo com Shapira (2011), a falta de seletividade às células cancerosas acarreta limitada bioacessibillidade de fármacos a tecidos tumorais, exigindo assim altas doses com consequente resistência a múltiplos fármacos.

Por outro lado, estudos realizados por Zhang et al. (2012) demonstram que o campo da nanotecnologia tem avançado durante a primeira década do século XXI, o qual foca no *design*, síntese, caracterização e aplicação de uma grande variedade de materiais com no mínimo uma dimensão de 100nm. Esses nanomateriais possuem propriedades físico-químicas que podem orientar para a criação de novas estruturas, sistemas, nanoplataformas ou dispositivos que podem possuir um potencial de aplicação em uma ampla variedade da área científica.

A nanociência e a nanotecnologia são áreas de conhecimento e inovação que têm despertado interesse cada vez maior da comunidade científica, de profissionais, do setor industrial e da mídia, podendo ser conceituada como um conjunto de técnicas utilizadas para a manipulação de átomos e moléculas visando a criação de novos materiais em escala nanométrica (10^{-9}m) (Brasil, 2011).

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que emergiu recentemente como um dos campos mais eficazes no tratamento do câncer. Atua através de materiais em nanoescala para a eliminação preferencial de células cancerosas sem sérios danos às células normais (Prakash et al., 2011).

No Brasil, não há uma definição consolidada sobre nanomedicamento, o qual apresenta diversas definições devido ao contexto em que é utilizado. Para fins de compreensão e considerações do presente estudo, adotou-se a seguinte definição:

> Nanomedicamento é toda substância ou combinação de substâncias elaborada que possuem distintas propriedades físico-químicas, usado com a finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico. Sendo esta, uma forma farmacêutica terminada que contém um fármaco em nanoescala ou associado a um nanoadjuvante com ação farmacológica específica visando modular funções metabólicas e fisiológicas. (ANVISA, 2014).

O desenvolvimento de nanocompostos (NCs) otimizam a liberação adequada de fármacos, isolados ou em combinação, sem sobrecarregar o organismo com doses altas de quimioterápico que levariam a danos em células sadias de forma não específica, causando certo grau de toxicidade e efeitos colaterais secundários (Pavon, 2007; Asai, 2012; Jabir et al., 2012).

Os nanocarreadores são uma classe emergente para o tratamento do câncer, apresentando diâmetro de 10 a 800 nm. Entende-se como:

> Nanoestrutura associada ou envolta a uma substância ativa (nanomedicamento), que seja capaz de transportar este nanomedicamento no organismo através de uma liberação controlada. (Cerize, 2012).

Com base em Misra et al. (2010), o sistema de nanocarreadores possuem propriedades únicas podendo: (1) possuir propriedades terapêuticas e/ou diagnósticas; (2) ter um *design* para carrear uma grande quantidade de fármacos; (3) ser sintetizados para acomodar várias moléculas de fármacos simultaneamente e permitir uma terapia combinatória do câncer; (4) ignorar o tradicional mecanismo de resistência do fármaco; (5) conseguir aumentar de forma concomitante a concentração do fármaco intracelular e os efeitos do quimioterápico nas células cancerosas, além de minimizar a toxicidade sistêmica; de acordo com Prakash et al. (2011), apresentam ainda as seguintes propriedades: (6) taxa constante de *drug delivery,* o que permite a manutenção de uma constante dose terapêutica no sítio específico; (7) aumento na estabilidade do fármaco devido à proteção da degradação.

Os nanocarreadores apresentam escala manométrica e por este motivo podem: (1) melhorar a estabilidade, solubilidade e absorção do fármaco, facilitando o carreamento de fármaco nas diversas barreiras existentes no organismo; (2) evitar reações pela presença de corpo estranho; (3) intensificar a tolerância local e sistêmica; (4) diminuir a proliferação da doença; (5) proteger células sadias adjacentes ao tumor; (6) permitir maior eficácia; (7) atenuar a toxicidade; (8) reduzir efeitos secundários e (9) solucionar resistência a múltiplos fármacos, permitindo a atividade farmacodinâmica esperada (Pavon, 2007; Asai, 2012; Jabir et al., 2012).

2.6.1 Óxido de grafeno reduzido

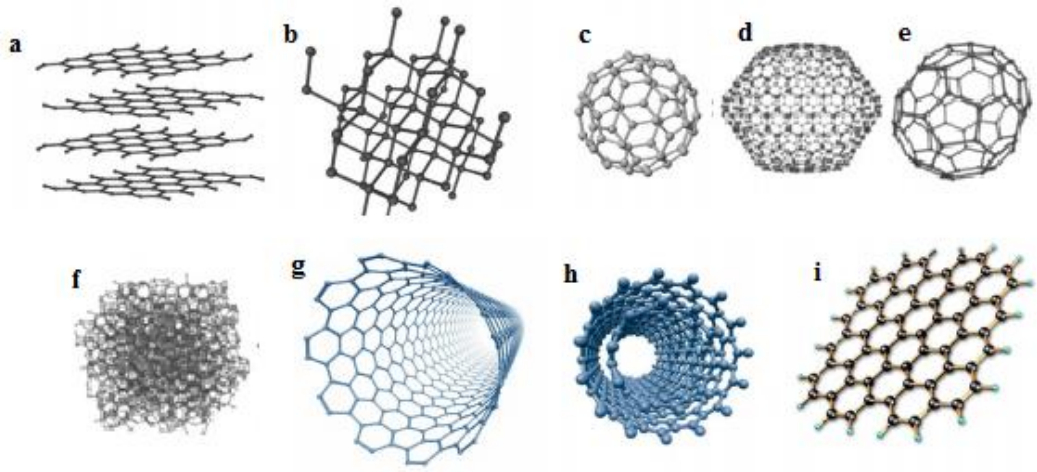
Materiais à base de grafeno tem atraído significativa atenção na comunidade científica, sendo que um importante acontecimento na pesquisa com o grafeno foi o ganho do Prêmio Nobel de Física em 2010, o qual foi atribuído a dois cientistas que primeiro descreveram filmes de grafite monocristalino em 2004 (Zhang et al., 2012). A partir de então o grafeno tornou-se conhecido por ser "superestrela" no campo da nanotecnologia, com aplicação em nanoeletrônicos, tecnologia energética (supercapacitores, baterias e compostos), como sensores e na aplicação biomédica. Estudos indicam que em 2020

produtos à base de grafeno alcançarão $675 milhões de dólares (Yang et al., 2013; Guo e Mei, 2014).

De acordo com Zhang et al. (2012), o grafeno apresenta uma monocamada de espessura atômica de átomos de carbono dispostos em duas dimensões (2D), semelhante a uma estrutura de favo de mel, podendo ser considerado um bloco de construção básico para outros materiais como grafite e os nanotubos de carbono.

As folhas planas de grafeno podem ser envolvidas em diferentes estruturas esféricas, como os fulerenos (0D, C20, C40, C60), enroladas em estruturas 1D, caso dos nanotubos de carbono, ou empilhadas em estruturas 3D, igualmente ao grafite (Nezakati et al., 2014). O grafeno é uma das formas cristalinas do carbono, assim como o diamante, grafite, nanotubos de carbono e fulerenos (Figura 9). É apresentado em forma de arame, composto por uma estrutura hexagonal de átomos de carbono, com ligação sp^2, sendo um material bidimensional, que podem ser rearranjados dando uma conformação morfológica com aplicabilidade diversificada. Em 1962 surgiu a nomeação através do pesquisador Hanns-Peter Boehm que combinou sua constituição grafite (carbono) com o sufixo *eno*, originando o termo grafeno (Cui et al., 2012; Huang et al., 2013; Zhou et al., 2013).

Figura 9: Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono: a- grafite; b- diamante; c- fulerenos; d- C540; e- C70; f- carbono amorfo; g- nanotubos de carbono de parede simples; h- nanotubos de carbono de parede múltipla; i-grafeno.



Fonte: a, b, c, g, h, i Zarbin e Oliveira (2013); d, e f http://www.chemicool.com/elements/carbon.html, acesso em: 15/01/2015.

As aplicações biológicas do grafeno e seus derivados (óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido) têm atraído a atenção da comunidade científica devido ao seu grande potencial para o diagnóstico de câncer, carreamento de fármacos e terapia fototérmica (Sun et al., 2008; Yang et al., 2010; Hong et al., 2012; Yan et al., 2012; Castillo et al.,

2013; Chen et al., 2013; Liu et al., 2013). Estudos realizados por Zhou et al. (2013) demonstraram em experimentos *in vitro* que o óxido de grafeno inibiu a migração e a invasão de células cancerosas humanas de mama, próstata e melanoma através da inibição da cadeia de transporte de elétrons, ocasionando a redução na produção de ATP, com subsequente desestruturação do citoesqueleto de actina F, o qual é fundamental para a migração e invasão de células neoplásicas metastáticas.

Estudos de Nezakati et al. (2014) apontam o interesse na nanomedicina dos materiais à base de grafeno (MBG), com efeitos colaterais mínimos, baixa toxicidade, alta eficiência na entrega do fármaco e maior biodisponibilidade do mesmo. Têm sido aplicados com sucesso no biosensoriamento com entrega direcionada e seletiva, bioimagem, cultura celular, detecção de câncer, entrega de gene, diagnóstico de doença, compostos antibacterianos, matérias antivirais, terapia fototérmicas, *drug delivery* e engenharia de tecidos. No tratamento do câncer, em associação com os quimioterápicos, têm mostrado ser bem sucedido em vários tipos de neoplasias, como a leucemia promielocítica aguda, além daquelas em pulmão, cabeça e pescoço.

Os nanomateriais da família do grafeno variam em número de camada, dimensão lateral, superfície química, densidade das folhas individuais de grafeno, composição e pureza (Sanchez et al., 2012). A melhoria da síntese e a modificação superficial versátil do grafeno abriu novos caminhos para a pesquisa em nanoescala. Devido ao curto intervalo de tempo desde sua descoberta, a aplicação de nanomateriais de grafeno na área biomédica está em estágio inicial e a maioria dos estudos apareceram nos últimos anos (Zhang et al., 2012).

A utilização combinada de dois ou mais fármacos é uma prática clínica amplamente adotada e que muitas vezes exibe melhor eficácia terapêutica que um fármaco isolado. Dessa forma a controlada adesão e especificidade de uma mistura de fármacos anticâncer usando nanocarreadores à base de grafeno pode ser aplicada na biomedicina (Zhang et al., 2010).

O óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) possuem diferentes naturezas físicas e químicas; o rGO tende a agregar em solução e mostra uma condutividade elétrica em comparação com GO. Verificou-se que o rGO afeta o comportamento celular devido sua capacidade de adesão em proteína e atividade antibacteriana em diferentes vias (Kanayama et al., 2014).

Os elétrons π deslocados no plano do grafeno permitem ainda a ligação a várias moléculas de fármaco aromático via interações π-π através da conjugação funcionalizada

de GO ou rGO com ligantes direcionados. Os MBGs com superfície de funcionalização diferentes têm sido explorados como nanocarreadores para adesão de uma variedade de fármacos quimioterápicos, podendo ser física ou por conjugação covalente, devido à entrega de fármacos seletivos a tipos específicos de células neoplásicas motivado pelo sucesso em usar nanotubos de carbono no sistema de *drug delivery* (Yang et al., 2013).

Apesar dos MBGs constituírem potenciais ferramentas em aplicações biomédicas, ainda pouco se sabe da influência direta dos compostos sobre a migração, progressão e metástases tumorais (Zhou et al., 2013).

2.6.2 Funcionalização rGO com Pluronic® F68

A superfície química dos nanomateriais é a chave para melhorar a biocompatibilidade e controlar o comportamento em sistema biológico. A presença de cada átomo exposto na superfície do grafeno leva a uma ultra-área superficial disponível, a qual permite eficiente adesão molecular e bioconjugação. Essa área disponível é amplamente explorada como um nanocarreador de fármacos e genes. Uma variedade de nanocompostos inorgânicos podem ser agregados à superfície de moléculas de grafeno, obtendo-se um nanocomposto baseado no grafeno funcional com propriedades ópticas e magnéticas (Yang et al., 2013).

Os MBGs estabilizados funcionalmente são menos tóxicos que os similares não funcionalizados (Zhang et al., 2012). Além de reações químicas covalentes, o grafeno pode ser funcionalizado não covalentemente por polímeros ou biomoléculas via interações hidrofóbicas, ligação π-π, ou ligações eletrostáticas. Através de interações não covalentes, o grafeno e o GO podem ser estabilizados por um surfactante ou polímeros anfifílicos para melhorar as suas estabilidades em soluções aquosas (Yang et al., 2013).

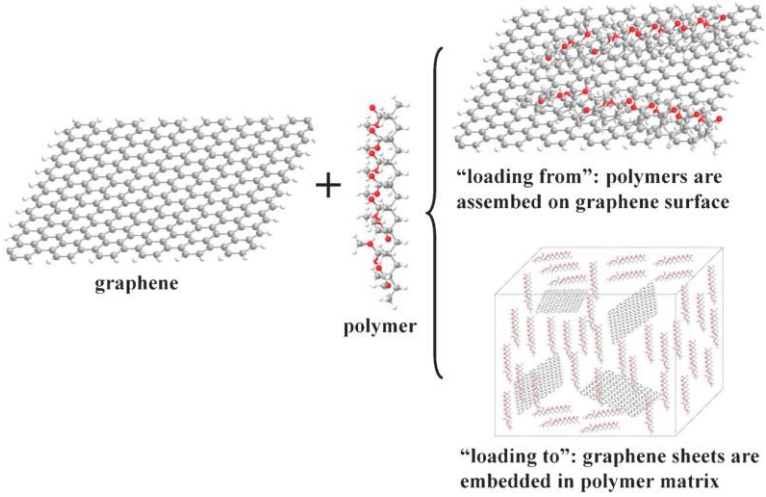
De acordo com Sanchez et al. (2012), ambos os lados de uma única folha de grafeno podem ser usados como substrato para adição controlada ou adsorção de moléculas e grupos funcionais devido sua estrutura em formato 2D.

Na funcionalização covalente, os MBGs tornam-se solúveis devido às modificações químicas em sua estrutura orgânica. Essa funcionalização pode ser feita nas paredes e/ou extremidades, caso dos nanotubos, onde grupos funcionais são ligados através de tratamento oxidativo usando ácidos fortes e reações orgânicas de adição e/ou substituição (Ramanathan, 2005).

Com base em Petrov et al. (2003), verificou-se que a funcionalização não covalente de MBGs utiliza tensoativos como dodecilsulfato de sódio (SDS), dodecilsulfonato de sódio (SDSA), dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS), polímeros ou biopolímeros em procedimentos de impacto físico como ultrasonicação, centrifugação ou filtração. Nesse método preservam-se as estruturas químicas dos MBGs, não ocorre modificação das características mecânicas e eletrônicas da superfície, fornecendo energia para superar as forças de Van Der Waals existentes entre os compostos, diminuindo assim sua agregação. A dispersão em tensoativos não iônicos é proporcional ao tamanho da cadeia alquílica, assim quanto maior o peso molecular do tensoativo melhor será a dispersão dos compostos baseados em grafeno.

Estudos realizados por Liu et al. (2008) comprovam que as cadeias poliméricas melhoraram a dispersão de solventes através de dois processos: "*loading from*" e "*loading to*" (Figura 10). No estudo, foi escolhido o "*loading from*" que consiste do MBG como matriz para a adesão de polímeros na superfície. Este processo é bastante utilizado para regular a solubilidade. De acordo com Yang et al. (2013), o rGO pode ser funcionalizado não covalentemente com polímero anfipático do tipo PEG obtendo-se uma solução biológica estável.

Figura 10: Representação esquemática do modo de dispersão do solvente: "*loading from*" e "*loading to*".



Fonte: Liu et al. (2008).

Petrov et al. (2003) afirma que tensoativos são rotineiramente incorporados em formulações farmacêuticas para melhorar os sistemas de liberação. Conforme Florence e Attwood (2003), os agentes tensoativos são caracterizados por possuírem em sua

molécula uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Quando os tensoativos se dissolvem em água com baixas concentrações, tendem a procurar a superfície e se orientar de tal modo que removam o grupo hidrofóbico do meio aquoso, alcançando assim o estado de energia livre mínima. Considerando que as forças de atração intermoleculares entre as moléculas de água e grupos apolares são menores que as existentes entre as duas moléculas de água, a força de contração da superfície é reduzida. Desta forma a tensão superficial diminui e o aumento da concentração da camada superficial fica saturada de moléculas de tensoativos, cuja porção hidrofóbica passa a se proteger do ambiente aquoso formando micelas.

Sistemas de liberação compostos por tensoativos, em geral, oferecem um grande número de vantagens para a liberação de fármacos, entre elas: (1) permitem a solubilização de fármacos hidrofílicos e lipofílicos; (2) formam estruturas pela simples auto associação dos componentes, visto que as formulações são facilmente preparadas (Malmsten, 2002); (3) permitem o aumento da solubilidade de fármacos; (4) diminuem a degradação, controlam ou prolongam a taxa de liberação, e possibilitam compartimentalização do fármaco, podendo direcioná-lo para os sítios onde deverá exercer o efeito farmacológico; (5) controlam a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química da molécula, passando a funcionar como sistema reservatório (Oliveira et al., 2004); (6) alteram a permeabilidade das células epiteliais modificando a bicamada fosfolipídica, o que aumenta a permeabilidade dos fármacos através de epitélios (Illum, 2003).

O bloco do copolímero polioxietileno-polioxipropileno-polioxipropileno, Pluronic® F-68 (PF-68) (PEO_{78}-PPO_{30}-PEO_{78}, massa molar de 8400g/mol) é um surfactante sintético não-iônico, com massa molecular média aproximadamente 8,4kDa que apresenta um centro hidrofóbico de cadeias de propileno e caudas hidrofóbicas de óxido de etileno (Michaels et al., 1996) (Figura 11). Possui efeito protetor através da diminuição da tensão superficial e pode ser relacionado com o aumento da resistência da membrana celular (Ma et al., 2004). A composição química do PF-68 assegura uma boa solubilidade em água por sua composição de PEO e pela alta capacidade de interação

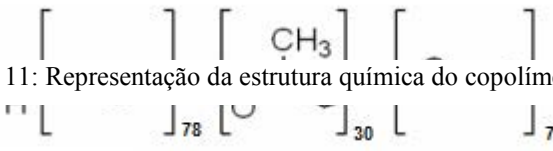


Figura 11: Representação da estrutura química do copolímero Pluronic® F-68.

Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Poloxamer&lang=4.
Acesso em: 31/12/2014.

hidrofóbica pelos blocos de PPO, formando uma ampla rede polimérica capaz de modular a liberação de fármacos (Yuen et al., 2008).

O mecanismo de mucoadesão do PF-68 é baseado em hidrogéis estímulo-sentitivos no qual o aumento da viscosidade é dado após um estímulo fisiológico que pode ser temperatura, pH, ou força iônica. O aumento da viscosidade pode promover a fixação da formulação e desta forma, os sistemas baseados em tensoativos podem atuar como sistemas estímulo sensitivo promovendo mucoadesão (Andrews et al., 2008; He et al., 2008).

2.7 Nanotoxicologia

As descobertas acadêmicas para produtos industriais com nanotecnologia fizeram surgir a preocupação sobre toxicidade, e com isso surgiu a nanotoxicologia. Esta refere-se ao estudo das interações de nanoestruturas com sistemas biológicos, ou seja, a relação entre as propriedades físico-químicas das nanoestruturas: tamanho, forma, grupos funcionais da superfície química, composição, agregação (Fischer e Chan, 2007), além do teor de oxigênio (Guo e Mei, 2014), podem afetar a resposta biológica, desencadeando os mecanismos de biodistribuição, depuração, resposta imune e metabolismo (Fischer e Chan, 2007).

No mesmo trabalho os autores relatam que as nanoestruturas, resumidamente, comportam-se da seguinte maneira: as nanoestruturas entram no organismo através da via de administração; ocorre absorção por componentes biológicos, células ou proteínas; os quais são distribuídos ou permanecem no mesmo sendo modificados e metabolizados ou não; entram nas células dos órgãos e residem por tempo determinado e podem deslocar para outros órgãos ou serem excretadas, podendo ocorrer excreção antes ou após entrarem nas células.

O interesse pela nanotoxicologia deve-se à interação entre as nanoestruturas e as células e consequentemente, aos efeitos moleculares desencadeados, por exemplo a inflamação. A nanotoxicidade pode ocorrer devido aos seguintes fatores: (1) as nanoestruturas quebram gerando efeito tóxico ao organismo; (2) a superfície das nanoestruturas pode estar envolvida em reações catalíticas e oxidativas, que podem

induzir à citotoxicidade; (3) alguns metais presentes nas nanoestruturas podem ter uma toxicidade conhecida (Fischer e Chan, 2007).

A citotoxicidade é afetada pela concentração, forma, tamanho, carga superficial, energia e molhabilidade da nanoestrutura. As reações citotóxicas levam à inflamação devido a EROs, dano celular e peroxidação lipídica da membrana celular. Esses eventos causam alteração na expressão gênica e na sinalização celular (Nezakati et al., 2014).

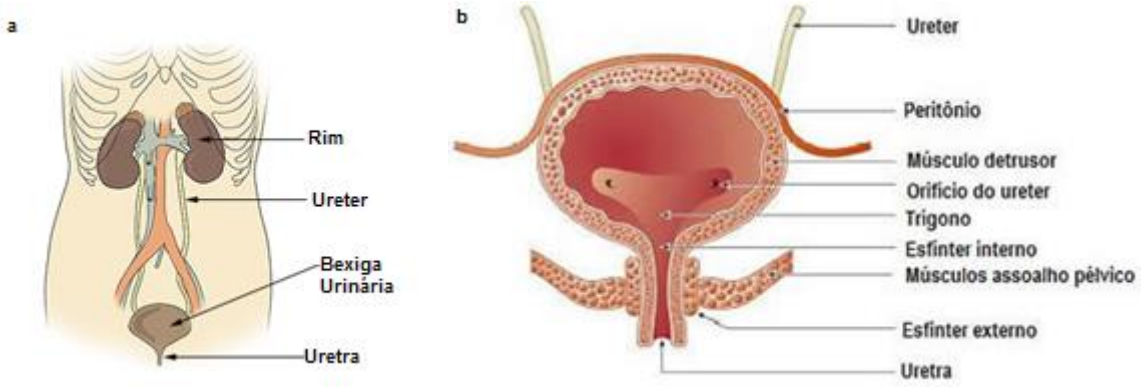
A potencial toxicidade dos MBGs, desde células procarióticas até células de mamíferos, tem levado a um intenso debate nos últimos anos. Seu uso em laboratórios acadêmicos e nas indústrias exige um melhor entendimento dos possíveis impactos negativos na saúde humana. O grafeno puro e GO tendem a ser tóxicos em animais de laboratório de maneira dose-dependente e sua funcionalização leva a redução dessa toxicidade (Yang et al., 2013), o que pode ser comprovado pelo estudo realizado por Guo e Mei (2014) onde uma dispersão de grafeno com Pluronic® reduziu a toxicidade, mostrando que a superfície pode modular a toxicidade do grafeno *in vivo*.

Estudos realizados por Nezakati et al. (2014) indicam que MBGs podem penetrar nos tecidos do coração, baço, rim, medula óssea e fígado. A avaliação de risco identificou qualitativamente a natureza dos efeitos adversos e quantitativamente efeitos de dose e relação dose-resposta, envolvendo reações de adsorção e agregação.

2.8 Bexiga urinária e o potencial da via intraperitoneal para liberação sistêmica de fármacos

A partir dos seis anos de idade, a bexiga urinária está localizada na pelve entremeada ao peritônio e, quando repleta, pode alcançar a região umbilical. É fixada pelos ligamentos pubo vesicais na mulher e ligamentos pubo prostáticos no homem, e o restante é mantida pela gordura pélvica e tecido fibroso, o que permite sua distensão (Figura 12). O ápice geralmente é o ponto de inserção do ligamento umbilical médio e úraco. A bexiga vazia tem o formato de uma pirâmide. Os ureteres atravessam de forma oblíqua a parede da bexiga o que permite que, quando cheia, a compressão e fechamento os ureteres, prevenindo o refluxo (Young, 2006).

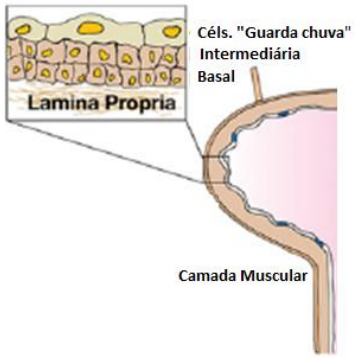
Figura 12: a- Representação da localização da bexiga urinária. b- Representação da bexiga urinária.



Fonte: a- Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Bexiga. Acesso em 31/12/2014.b- Disponível em: http://www.iad-goiania.com.br/node/71. Acesso em 31/12/2014.

Rica em vasos sanguíneos, inervação motora e sensitiva, além de vasos linfáticos (GuhaSarkar e Banerjee, 2010), a bexiga urinária é suprida por dois pares de vasos: artérias vesicais inferiores e superiores e pela artéria ilíaca interna. A drenagem linfática das porções anteriores e posteriores é realizada pelos linfonodos ilíacos externos, enquanto que na região de trígono é realizada por esses e pelos linfonodos hipogástrico e superior (Young, 2006).

Figura 13: Representação dos tipos celulares componentes do urotélio: células basais, células intermediárias, células do tipo "guarda-chuva".



Fonte: http://www.pathologika.com/citologia-urinaria/ Acesso em 15/10/2014.

O urotélio é um epitélio especializado que funciona como barreira primária da bexiga urinária, protegendo o organismo contra o ambiente externo, estando constantemente exposto a agentes genotóxicos, o que aumenta o risco de ocorrer mutação (Knowles, 2007; Ayari et al., 2011). Estudos realizados por DeGraff et al. (2011) mostraram que essa barreira é do tipo pseudo-estratificada com discretas células epiteliais.

De acordo com GuhaSarkar e Banerjee (2010), o urotélio é composto por três tipos de células: células basais, células intermediárias e células superficiais com as características de "células guarda-chuva". Estas apresentam formato hexagonal e características distintas que permitem impermeabilidade. Esse epitélio abrange a totalidade da área e interior da bexiga urinária (Figura 16).

Por outro lado, a presença de uma camada de mucina aderida ao lado luminal composta por glicosaminoglicanos (hidrofílicos) formam uma camada aquosa fina na porção superior da "célula guarda-chuva". Estas funcionam como uma camada antiaderente e impedem a adesão de partículas estranhas que podem ser absorvidas e chegar à circulação sistêmica ou na superfície urotelial. Deste modo, a barreira evita a difusão do fármaco para tratar os tumores ou mesmo áreas com lesões (Carvalho et al., 2010; GuhaSarkar e Banerjee, 2010). A permeabilidade dos fármacos pode ser aumentada quando a camada de mucina e as "células guarda-chuva" sofrerem uma ruptura estrutural ou química (GuhaSarkar e Banerjee, 2010).

Nas células uroteliais, o citoplasma é pouco corado, o núcleo central é predominantemente oval e a cromatina é fina e às vezes dispersa. Figuras mitóticas são incomuns e estudos com replicação de DNA revelam que o urotélio é renovado uma vez ao ano. A lâmina própria é uma zona de tecido conectivo que contém vasos delicados e finos além de fibras musculares delicadas que referem-se à camada muscular mucosa. Abaixo desta está a camada muscular própria, com ramos de grandes fibras musculares e de variadas espessuras em diferentes localidades da bexiga (Young, 2006).

Os fármacos quimioterápicos quando administrados passam por alterações farmacocinéticas (concentração, tempo de exposição, peso molecular, lipofilicidade) e características do tecido (superfície exposta ao fármaco, pressão hidrostática, perfusão sanguínea, drenagem linfática, permeabilidade da membrana celular do tecido) (Mohamed e Sugarbaker, 2003).

Nesse contexto, torna-se interessante o desenvolvimento de sistemas de distribuição de fármacos mucoadesivo que permitam a manutenção eficiente e aumentem a sua permeabilidade, prolongando o tempo de vida do fármaco.

Vale ressaltar que o tratamento convencional utilizado para pacientes com CBNMI é a RTU e a terapia intravesical adjuvante. Contudo segundo Tyagi et al. (2006), o uso de veículos para carreamento intravesical é inconveniente devido a diluição de fármacos pela urina residual e exposição constante na bexiga urinária.

Os estudos de Ye et al. (2014) relatam que uma forma de melhorar a entrega de quimioterápicos são os sistemas *drug delivery,* os quais permitem liberar o fármaco por um tempo prolongado, aumentando a meia vida e a área sob a curva de concentração. As partículas de tamanho entre 10 a 100nm facilitam a absorção pelas células tumorais através da permeação e efeito de retenção, reduzindo os mecanismos de resistência de fármacos pela exposição sistêmica e melhorando sua eficácia.

Nos últimos anos, diferentes sistemas de *drug delivery* foram estudados na administração intraperitoneal (i.p.), e entre eles temos: nanocarreadores, NCs com genes, micelas, micropartículas e hidrogéis de liberação sustentada na cavidade peritoneal (Dakwar et al., 2014).

Estudos realizados por Mohamed e Sugarbaker (2003) apontam que fármacos de elevado peso molecular na cavidade peritoneal são depurados em um ritmo mais lento, devido ao trajeto a ser percorrido: fluído da cavidade abdominal, mesotélio, insterstício, parede do vaso sanguíneo até atingir o compartimento vascular. Desta forma, o uso da terapia i.p. leva a uma concentração na cavidade peritoneal muito superior às concentrações no plasma, devido à depuração peritoneal, que trata-se da taxa de liberação da cavidade para o plasma. Assim, este modelo mostra uma vantagem farmacocinética de alguns fármacos intraperitoneais, por não ocorrer um intenso metabolismo do fármaco de primeira passagem no fígado.

A eficácia da terapêutica i.p. pode ser limitada pela baixa penetração do fármaco e a irrigação incompleta da camada serosa pela solução contendo o fármaco (Dedrick e Flessner, 1997). Uma crítica sobre a quimioterapia i.p. é o fato da concentração local e da profundidade de penetração do fármaco no tecido tumoral ser de cerca de 1-3mm. Existem ainda as complicações relacionadas ao cateter e requisitos cirúrgicos (Ye et al., 2014).

Por outro lado, existe um crescente interesse por parte dos médicos no tratamento de pacientes com terapia i.p., pois atualmente nenhum dos fármacos foi formulado especificamente ou mesmo testado pra terapia i.p. (Dakwar et al., 2014).

2.9 Metodologias empregadas para avaliar o desempenho da dispersão do nanocarreador de fármacos

2.9.1 Síntese e caracterização do óxido de grafeno reduzido

O óxido de grafeno reduzido foi sintetizado por técnicas de deposição química de vapor, obtendo-se um composto amorfo de cor preta, característica de compostos com carbono (Chemicool, 2015).

2.9.2 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X

A espectroscopia de energia dispersiva de raio X (EDS) é uma técnica não destrutiva, utilizada para identificar e quantificar os elementos químicos numa amostra. Quando um feixe atinge as amostras, seus átomos são excitados e, ao voltarem para o estado fundamental, emitem fótons com energias características do átomo. Os fótons são identificados pela energia e contados pelo detector de raio X, identificando os elementos químicos presentes, formando uma imagem dos elementos da amostra (Mamani, 2009)

O mesmo autor ainda explica o fenômeno da difração de raio X, supondo que as ondas de raio X são espalhadas por átomos individuais esfericamente na rede cristalina. Num certo comprimento de onda da radiação X incidente, o raio espalhado emergirá em ângulos para as quais esta condição é satisfatória. Cada pico da difração produzido permite a identificação do composto cristalino formado. Na caracterização das nanoestruturas quanto menor a distância entre os planos menor será o ângulo.

2.9.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

A microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV- FEG) é uma técnica de caracterização que consiste em submeter a amostra a um feixe de elétrons. Este interage com a região de incidência da amostra a uma profundidade variável conhecida como volume de interação, os quais geram sinais detectados e utilizados para a formação da imagem (Fernandes, 2008).

2.9.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) refere à caracterização de superfície de materiais. Esta técnica monitora os valores quantitativos de todos elementos químicos na superfície da amostra pela energia de ligação, fornecendo informações a respeito da composição química da superfície e natureza da ligação química. O raio X incidente induz a amostra a emitir fotoelétrons dos níveis internos dos átomos superficiais da mesma, característico de cada elemento. Desta maneira a energia

de ligação dos elétrons é influenciada pelo estado de oxidação e do ambiente químico (Maxwell, 2014).

2.9.5 Análise de Difração de raio X

A técnica de caracterização de materiais por difração de raio X (XRD) é indicada na determinação das fases cristalinas presentes nos materiais sólidos, isso porque na maioria dos sólidos os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza que uma onda de raio X (Mamani, 2009).

Um feixe de raio X incide, o qual interage com os átomos e sofre difração. Existe uma relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos característicos de cada fase (Aguiar, 2009).

2.9.6 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é considerada uma técnica óptica e pode ser usada para interpretar tecidos biológicos com especificidade química. Permite a compreensão de mudanças de constituintes moleculares que estão associados a patologia. O uso da espectroscopia de Raman iniciou na década de 1990 com vários grupos usando-a para diferenciar tecidos normais dos neoplásicos (Shetty et al., 2006; Stone et al., 2007; Draga et al., 2010).

Segundo Chen et al. (2014), essa técnica ideal para a análise espacial da estrutura da matéria, consiste de um espectro de emissão gerada por uma alta frequência, onde com base em Draga et al. (2010) fótons dotados de energia são espalhados nas bandas moleculares da amostra, através de um processo de espalhamento inelástico, resultando no espalhamento de luz deslocadas em longos comprimentos de onda. O mesmo autor relata ainda que o espectro possui picos que são as detecções de fótons espalhados, sendo cada pico específico para uma banda molecular levando a especificidade da amostra. Shetty et al. (2006) aponta que a banda depende de um deslocamento da interação com os modos vibracionais de moléculas, o deslocamento das bandas reflete as alterações nas moléculas. Draga et al. (2010) identifica que as vantagens da espectroscopia de Raman devem-se ao fato de não ser destrutiva e não requerer pré-tratamento.

2.9.7 Espectrofotômetro ultravioleta-visível

Espectroscopia de ultravioleta-visivel (UV-Vis) refere à análise da absorção de luz por uma amostra (absorção eletrônica). A luz UV e/ ou visível numa faixa de comprimentos de onda é passada pela amostra; a quantidade de luz absorvida é medida por um espectrofotômetro, sendo que a intensidade de luz antes de passar pela amostra é considerada I_0 e após por I. A transmitância da amostra é definida pela razão (I/I_0) (Silverstein et al., 2006).

2.9.8 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Specrtoscopy* (FTIR), é uma técnica onde a luz infra-vermelha (IV) é guiada através de um interferômetro, utilizando todos os comprimentos de onda desta faixa. Depois de passar pela amostra o sinal medido é o interferograma que após uma transformada de Fourier, processo matemático, converte os dados brutos para um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (dispersiva) (Brinatti, 2001).

De acordo com o mesmo autor, a FTIR parte do princípio que as ligações químicas das substâncias possuem frequência de vibrações específicas, que correspondem a níveis vibracionais de energia da molécula. Estes dependem de vários fatores, como geometria molecular, massa de átomos e ligações.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho da dispersão do nanocarreador de fármacos óxido de grafeno reduzido em solução de Pluronic® F-68 com a adesão de cisplatina e doxorrubicina aplicado no tratamento do CBNMI estabelecendo os efeitos destas estratégias terapêuticas.

3.2 Objetivos Específicos

O mesmo foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

- Caracterização do rGO;

- Caracterização da histopatologia do CBNMI de ratos induzidos quimicamente e comparação da progressão tumoral frente às formulações de rGO associadas aos quimioterápicos CIS e DOXO;

- Avaliação da toxicidade das formulações utilizadas;

- Caracterização e comparação dos efeitos das formulações de rGO associadas aos quimioterápicos CIS e DOXO sobre os fatores indutores e reparadores de lesão celular (PTEN, PI3K e Nrf2) e formadoras de EROs (Nox1) por imunomarcação no CBNMI de ratos induzidos quimicamente;

-Comparação dos efeitos das formulações de rGO associadas aos quimioterápicos CIS e DOXO pela medição do espectro Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de Raman nas bexigas urinárias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese do óxido de grafeno reduzido

O óxido de grafeno reduzido foi sintetizado pelo grupo de pesquisa do Dr. Helder Ceraglioli do Departamento de Engenharia de Materiais e Ciência da Computação da Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil, colaborador desse projeto de pesquisa, segundo método descrito por Zanin et al. (2014).

4.2 Caracterização do óxido de grafeno reduzido

O composto de rGO foi caracterizado segundo técnicas descritas abaixo para conhecer suas propriedades, uma vez que estas possuem impacto na solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade química dos fármacos.

4.2.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X

As análises químicas foram realizadas utilizando o detector de Si (Li) modelo *Noran Instrument*, com energia de resolução de 126 eV, acoplado a um microscópio eletrônico de varredura *equipamento Inspect FEI-F50*.

4.2.2 Dispersibilidade do rGO

Foi determinada a solubilidade do rGO em três soluções diferentes: água, dimetilsufóxido (DMSO) e Pluronic® F-68, em temperatura ambiente.

Uma porção de rGO na concentração de 10mg/L foi suspenso em solução, ficando em agitação durante 30 minutos. As soluções permaneceram em repouso por 30 minutos e foram observadas e avaliadas macroscopicamente.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

A morfologia e análise dimensional foi analisada pelo *equipamento Inspect FEI-F50* para avaliar as disposições estruturais e monitorar modificações detalhadas sobre a morfologia da superfície.

4.2.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Foi utilizado o equipamento modelo *espectrômetro VSW HA 100*, com analizador hemisférico operando em modo de transição contínua, o que resultou em largura de linha para Au 4F7/ 2 1.6eV. Para exitação dos eletrons da radiação Al Ka, foi usado 1486.6 Ev.

4.2.5 Análise de Difração de raio X

A técnica de caracterização de materiais por difração de raio X (XRD) determinou as fases cristalinas presentes nos materiais sólidos através do equipamento modelo *Shimadzu XRD 7000*.

4.2.6 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman foi utilizada para avaliação qualitativa do grau estrutural dos materiais, uma vez que esta técnica possibilita a diferenciação entre as diferentes formas alotrópicas do carbono, identificando formas cristalinas e amorfas.

Foi empregado modelo *Renishaw 2000 system* com excitação do laser de íon de Ar^+ (λ = 514.5 nm) para analisar as mudanças estruturais do composto.

4.2.7 Espectrofotômetro ultravioleta visível

Para a avaliação da quantidade de luz absorvida foi usado o equipamento modelo *UV-1650 PC Shimatzu*.

4.2.8 Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier

Para essa leitura foi empregado o equipamento modelo *Spotlight 400 – Perkin-Elmer* para identificar o teor de oxigênio da amostra nas ligações químicas.

4.3 Funcionalização rGO em Pluronic® F-68

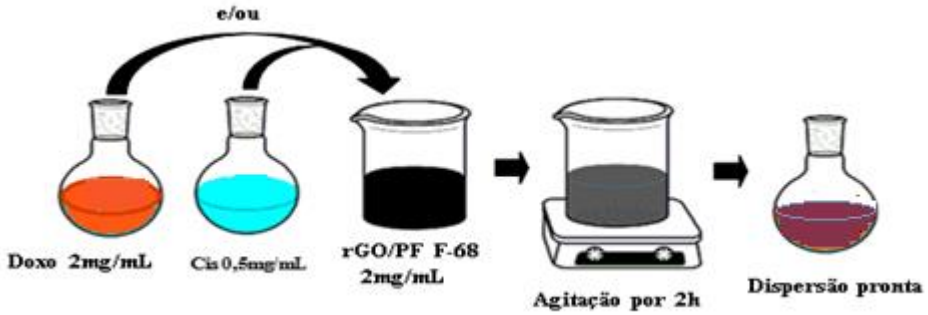
Para a obtenção de rGO biocompatível e conseguir um melhor comportamento em sistema biológico estável, o rGO disperso em solução fisiológica 0,9% foi adicionado em solução a 1% de PF-68. A concentração obtida de rGO foi de 2mg/mL. Após foi ultrassonicada durante 20 minutos em ultrassom USC 1400.

Neste contexto, no presente estudo foi escolhido o copolímero não-iônico Pluronic F-68, disponível comercialmente como dispersante do rGO.

4.4 Adesão da cisplatina e doxorrubicina na dispersão de rGO/PF-68

A associação não covalente dos quimioterápicos na dispersão de rGO/PF-68 foi realizada a partir de solução padrão de doxorrubicina (2mg/mL) e/ou cisplatina (0,5 mg/mL) em solução fisiológica 0,9%, dependendo do composto a ser usado. A adição dos quimioterápicos na dispersão de rGO foi na proporção 1:1. A dispersão obtida permaneceu sob agitação durante duas horas, formando então a dispersão usada no tratamento (Figura 14).

Figura 14: Representação esquemática da adesão dos quimioterápicos na dispersão de rGO/PF-68.



4.5 Aplicações das dispersões de rGO combinadas com os quimioterápicos CIS e DOXO no modelo animal CBNMI

4.5.1 Amostra

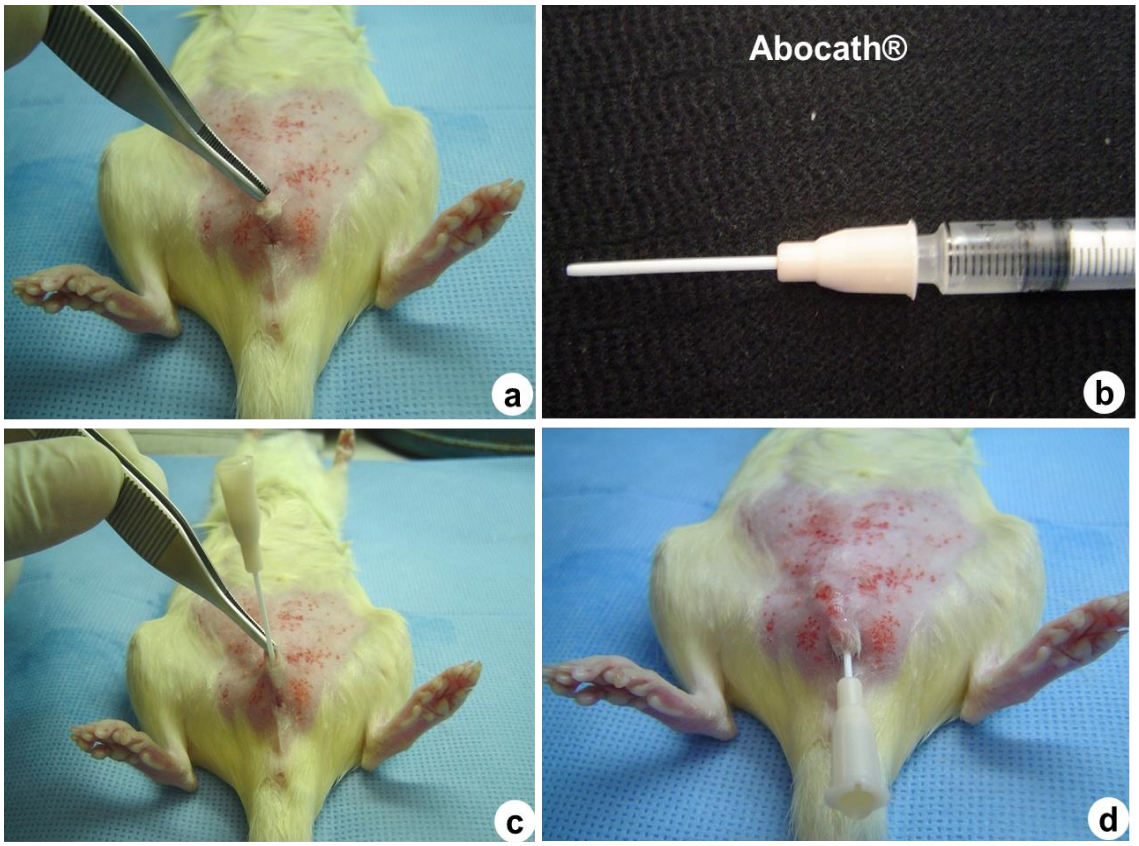
Foram utilizadas 30 ratas da linhagem Fischer 344 na faixa etária de sete semanas, pesando em média 150 gramas, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Campinas-Unicamp, por estarem de acordo com os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" (Protocolo n°3569-1).

Os animais foram mantidos em biotério, sendo dois animais por gaiola com cama do tipo maravalha. As gaiolas ficavam em rack ventilada com exaustão de ar. Os animais receberam água clorada e a alimentação baseou na dieta sólida industrial *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*).

4.5.2 Indução do CBNMI

Para a indução do CBNMI, 25 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Ketamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*). Foram 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 citrato de sódio (1M pH 6,0) via intravesical (i.v.) a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Fávaro et al., 2012).

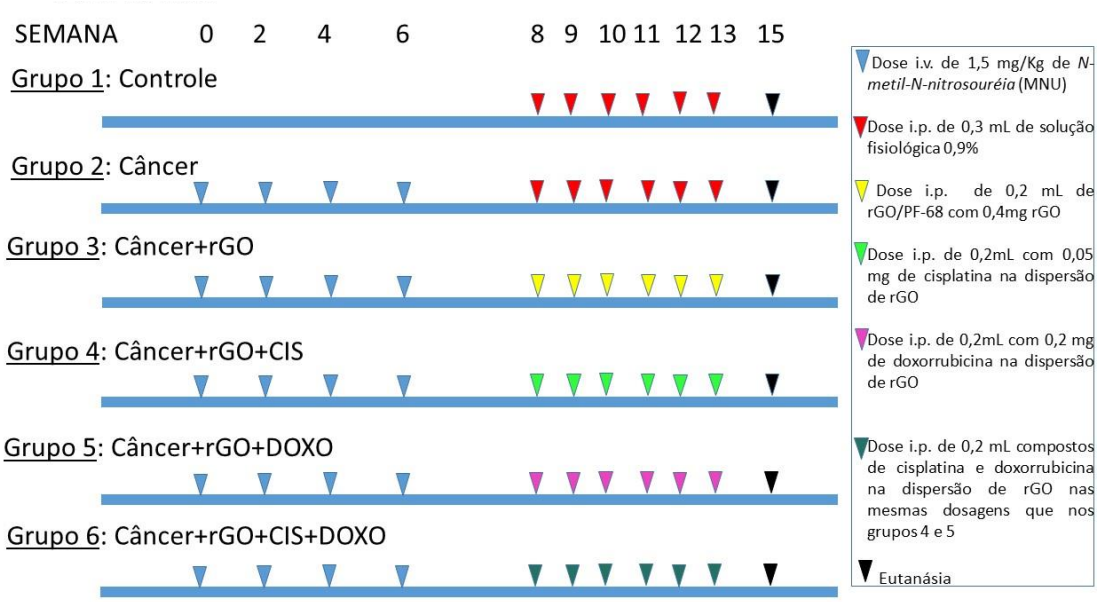
Figura 15: (a,c,d) Fotografias do modelo de indução CBNMI. (b) Abocath® utilizado para instilação intravesical do MNU.



4.5.3 Seleção do Grupo controle e grupos experimentais

Cinco animais que não receberam MNU foram considerados como Grupo Controle. Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram submetidos ao exame de cistografia para avaliar a ocorrência de tumor e, posteriormente divididos em seis grupos, os quais foram agrupados segundo Figura 16.

Figura 16: Representação esquemática dos grupos de animais.



- **Grupo 1: Controle:** recebeu uma dose intraperitoneal (i.p.) de 0,2 mL de solução fisiológica 0,9%, uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas;

- **Grupo 2: Câncer:** recebeu o mesmo tratamento que o grupo Grupo 1;

- **Grupo 3: Câncer+rGO**: recebeu uma dose i.p. de 0,2 ml com 0,4mg do composto de óxido de grafeno reduzido (rGO) uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas;

- **Grupo 4: Câncer+rGO+CIS**: recebeu uma dose i.p. de 0,2 ml com 0,05 mg de cisplatina (CIS) complexada na dispersão de rGO uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas;

- **Grupo 5: Câncer+rGO+DOXO**: recebeu uma dose i.p. de 0,2 ml com 0,2 mg de doxorrubicina (DOXO) complexada na dispersão de rGO uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas;

- **Grupo 6: Câncer+rGO+CIS+DOXO**: recebeu uma dose i.p. de 0,2 ml dos compostos de CIS e DOXO complexada na dispersão de rGO nas mesmas dosagens que nos grupos 3, 4 e 5 uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas.

Após 16 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por apronfundamento da anestesia; foi coletado sangue total e bexigas urinárias, as quais foram submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas, espectroscopia infravermelho transformada de Fourier e espectroscopia de Raman.

Os animais foram descartados por incineração.

4.6 Análises Histopatológicas

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

4.7 Testes bioquímicos

Para a realização dos testes bioquímicos foram coletados 2 mL de sangue total, obtido por punção cardíaca do ventrículo esquerdo, sem anticoagulante de todos os animais em estudo e centrifugados em centrífuga modelo *Excelsa® II 206-BL* a 2500 RPM por 10 minutos para separaão do soro. Depois foram transferidos para túbulos do tipo *Eppendorfs,* acondicionados em coletor universal e armazenados a -20°C até o processamento das análises.

No plasma congelado foram realizadas análises bioquímicas em parceria com o Laboratório Central de Análises Clínicas (Conchal, São Paulo, Brasil), buscando determinar a funcionalidade hepática, sendo avaliado os seguintes parâmetros: transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) pelo método cinético automatizado (MINDRAY BS-200). Os testes bioquímicos de

funcionalidade renal avaliados, uréia e creatinina, foram realizados pelo método enzimático automatizado (COBAS MIRA S).

4.8 Imunomarcação para NOX 1, Nrf2, PI3K e PTEN

As amostras da bexiga urinária de todos os animais foram utilizadas para as imunomarcações, sendo as mesmas usadas para as análises histopatológicas. Foram obtidos cortes com 5 µm de espessura no micrótomo rotativo *Leica RM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100ºC em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H_2O_2 (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3% em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos PI3K, PTEN, NOX1 e Nrf2 foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* sc-67306 (*Santa Cruz Biotechnology, EUA*) para PI3K, monoclonal *rabbit* 9559L (*Cell Signaling Technology, EUA*) para PTEN, policlonal *rabbit* bs-3682R **(***Bioss Inc*., EUA) para NOX1 e policlonal *rabbit* ab31163 (*Abcam*, EUA) para Nrf2 diluídos em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4ºC. O *kit MACH 4 Universal HRP-Polymer* (*Biocare Medical, EUA*) foi usado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit MACH 4* por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (*Zeiss, Munique, Alemanha*).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células uroteliais da bexiga urinária positivas foi examinada em dez campos para cada anticorpo com aumento de 400x. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como zero (ausência de imunorreatividade), 0% de células uroteliais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células uroteliais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células uroteliais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células uroteliais positivas (Reis et al., 2012).

4.9 Medição de Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier

O experimento foi realizado na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação no Departamento de Semicondutores Instrumentos e Fotônica, Unicamp - Campinas/ SP

Fragmentos da bexiga urinária foram congelados em nitrogênio líquido e colocados em frezeer a -80°C. Foi utilizado o espectrofotômetro da *PERKN-ELMER modelo vertex 70v (EUA)* equipado com nitrogênio líquido para resfriar o detector de mercúrio-cádmio-telluride sob configuração de detector de reflexão total atenuada (ATR). Pequenas quantidades de amostra de tecidos foram prensadas sob vácuo. Os espectros foram obtidos a partir de laser de L-neônio com compriemnto de onda de 630nm.

4.10 Medição de Espectroscopia de Raman

O experimento foi realizado na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação no Departamento de Semicondutores Instrumentos e Fotônica, Unicamp - Campinas/ SP.

Fragmentos da bexiga urinária foram congelados em nitrogênio líquido e colocados em frezeer a -80°C. Para obtenção dos espectros de Raman foi empregado o modelo *in Via Renishaw microscope 2000 system (*Inglaterra) com excitação por laser de infra vermelho com λ= 785nm e lente de magnificação de 20x. As amostras foram submetidas às mesmas condições de análise, sendo o campo de observação escolhido aleatoriamente e foi representativa para o espectro da amostra.

4.11 Análise Estatística

Utilizando um poder do teste de 90%, significância de 0,05 e considerando o desvio máximo de 20% e a diferença esperada de 50%, o *n* foi igual a cinco animais por grupo (Eng, 2003).

Os parâmetros bioquímicos foram comparados através do *one way Analysis of Variance* (ANOVA) com nível de significância de α= 5%. No caso de existir diferença estatística entre as médias (média ± desvio padrão) foi utilizado um teste para determinar quais níveis ou tratamentos diferem entre si, sendo o Teste de Tukey o que fornece resultados mais confiáveis e o de escolha para análise de diferença entre médias

(Compton, 2011), sendo que as duas médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey.

As análises imunohistoquímicas para os diferentes antígenos foram avaliadas através do teste de proporção. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do rGO

5.1.1 Espectroscopia de energia dispersiva de raio X

A análise de EDS foi demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2: EDS Análise do óxido de grafeno reduzido.

Espectro dos elementos	C	O	Ni	Cu	Total
Peso (%)	94,09	5,43	0,06	0,42	100
Desvio Padrão	1,95	1,81	0,02	0,13	

A análise mostrou um residual de contaminação por níquel (Ni) e cobre (Cu) do catalisador.

Segundo Guo e Mei (2014) o grafeno pode ser sintetizado por vários métodos, como por esfoliação mecânica ou química, tornando inevitável a presença de impurezas residuais. Nos casos de materiais de GO altamente purificados, produz-se efeitos negativos negligenciados *in vitro* e *in vivo,* indicando a necessidade de considerar as impurezas para os efeitos biológicos. A presença de contaminantes durante a síntese pode contribuir para seus efeitos adversos, embora os mecanismos de toxicidade ainda não estabelecidos, a formação de EROs é o mecanismo reconhecido para a toxicidade induzida.

5.1.2 Dispersibilidade do rGO

De acordo com os estudos de Konios et al. (2014), o rGO possui maior interação com solventes apolares, como clorofórmio, tolueno, clorobenzeno. No mesmo estudo eles ainda afirmam que o rGO apresentou boa dispersibilidade em água devido a presença de grupos funcionais de oxigênio residuais presente no composto e repulsão eletrostática. Esta repulsão é característica de compostos carregados negativamente, levando a formação de uma solução aquosa relativamente estável. Tais informações diferem dos resultados aqui observados onde a dispersibilidade em água foi extremamente baixa.

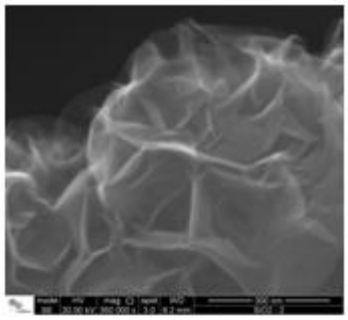
Segundo estudos de LiJing (2013) o rGO é dispersível em solução de DMSO em concentração superior a 4mg/mL. No presente estudo a concentração de rGO utilizada de 0,01mg/mL confirma a não dispersão com o DMSO.

A dispersibilidade do rGO com PF-68 mostrou solubilidade, o que pode ser sustentado com estudos de Shanmugam et al. (2014), onde verificou-se que o Pluronic-F68 leva a formação de soluções biologicamente estáveis com rGO.

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo

Na Figura 17 observamos a imagem de MEV-FEG, onde notou-se as nanofolhas.

Figura 17**:** MEV-FEG do rGO

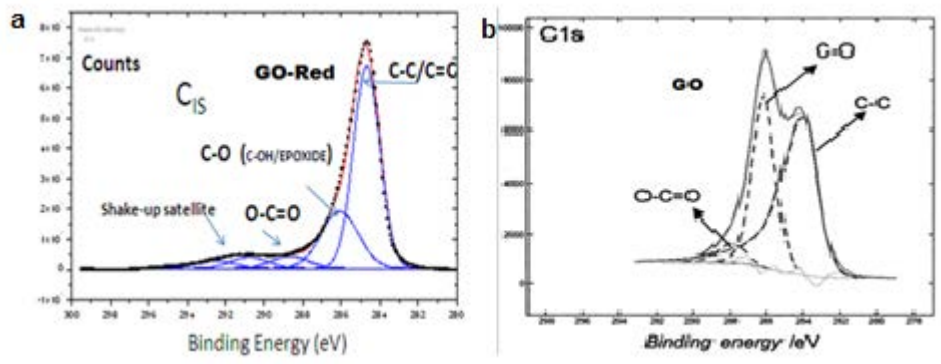


5.1.4 Espectroscopia de fotoeletrons excitados por raios X

5.1.4.1 XPS- Carbono (C_{1S})

Na Figura 18 identificamos a quantidade de Carbono presente na amostra em análise. Foi possível notar alteração na composição entre o composto em análise e o padrão. O XPS forneceu análise quantitativa demonstrando alta concentração de ligações entre os C e baixa entre C e O, diferindo do composto padrão.

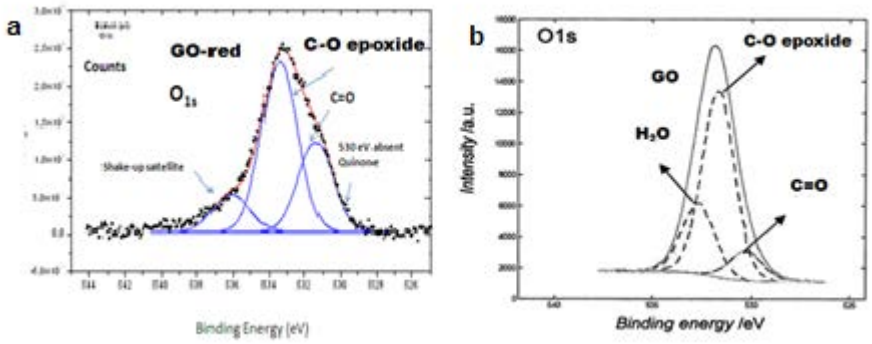
Figura 18: Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS) Analise do C_{1S} do rGO (a) e padrão de GO (b).



5.1.4.2 XPS-Oxigênio (O_{1s})

No XPS de O_{1s} do rGO (Figura 19a) apresentou espectro alterado como no caso do C_{1S} no padrão de GO (Figura 19b). Foi observado uma ausência dos grupos de quinone ou semi quinone ou demais estruturas conjugadas do grupo carbonil, oxigênio duplamente ligado ao carbono aromático, característicos do GO, indicando que diminuiu o grau de oxidação na amostra, mostrando tratar de rGO.

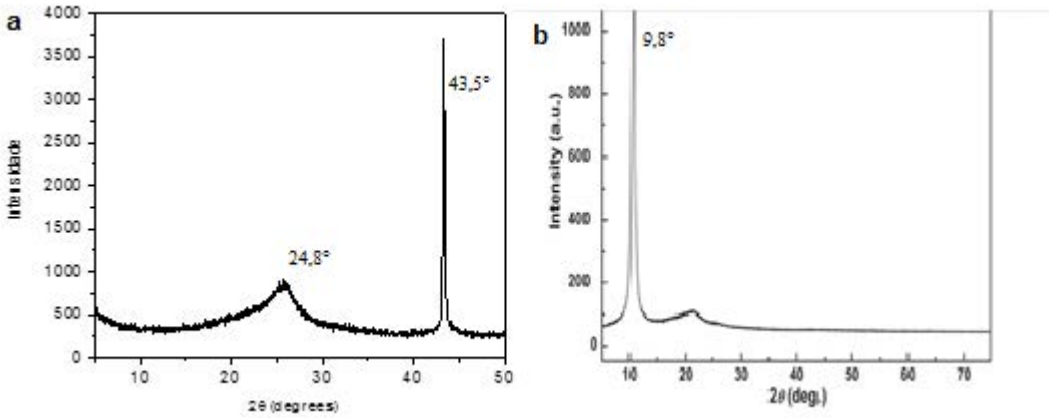
Figura 19: Espectroscopia fotoelétrica de raio-X (XPS) análise do O1s do rGO(a) e do padrão GO (b).



5.1.5 Análise da difração de raio-X

Conforme Figura 20, o GO foi quase completamente reduzido depois da síntese usando elevada temperatura (> 400°C). Não foi notado traços de GO nessa amostra quando observado em 9.8º(2θ) correspondendo ao padrão de GO (Figura 20b). Essa amostra somente mostrou rGO em 24.8º (2θ) e ao redor de 43.5º(2θ) devido as impurezas por níquel. Provavelmente nesse caso não foi detectado GO devido sua baixa concentração (menos de 5% GO comparado com 95% de rGO) ou outro artefato.

Figura 20: XDRrGO (a) e do padrão de GO (b).



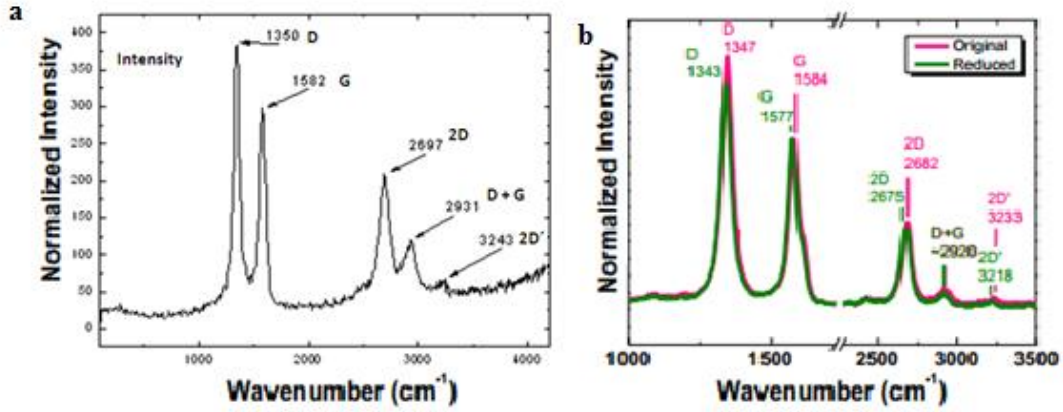
5.1.6 Espectroscopia de Raman

A Figura 21a demonstra que a banda D aparece em 1350 cm^{-1} e a banda G aparece em 1582 cm^{-1}. As outras bandas de Raman foram 2697 cm^{-1} (banda-2D), 2931 cm^{-1} (banda D + G) e 3243 cm^{-1} (banda-2D´).

A banda 2D pode ser usada para determinar o número de camadas do GO, sendo que no GO multicamada a mesma é menor e mais extensa no GO monocamada a banda 2D é mais intensa e nítida em comparação a banda D.

Geralmente a razão D/G no GO é 1,43 e na sua forma reduzida é 1,26, com os picos na forma reduzida deslocados para baixo do desvio do comprimento de onda. Podemos observar na Figura 21b, que a razão do Raman entre as bandas D/G foi 1,31, indicando que o GO está na forma reduzida e a banda D foi deslocada de 1354 para 1350 cm^{-1} (Yu et al., 2011).

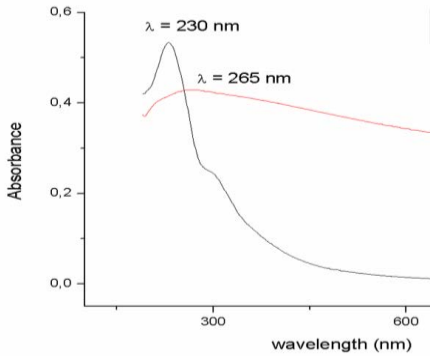
Figura 21: Espectroscopia de Raman de rGO (a) e GO (vermelho) e rGO (rosa)(b).



5.1.7 Espectro Ultravioleta –visível

O espectro foi monitorado pelo espectrofotômetro UV-Vis conforme Figura 22.

Figura 22: Espectroscopia do UV-Vis padrão de GO em λ 230 nm e rGo em λ 265 nm.

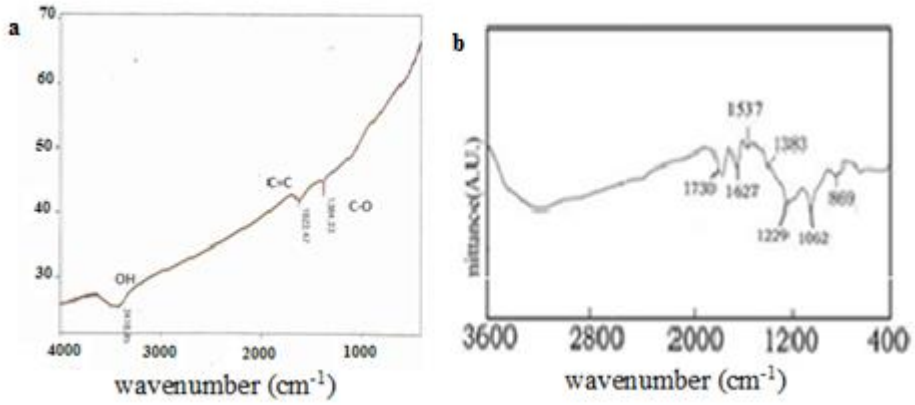


O espectro UV-Vis do GO padrão exibe uma banda no comprimento de onda 230nm e a amostra de rGO apresenta um comprimento de onda de 265nm, identificando que trata-se de um rGO.

5.1.8 Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier

Espectroscopia do FTIR da amostra de GO e rGO pode ser observado na Figura 23.

Figura 23: Espectro de FTIR rGO (Figura a) e espectro de GO padrão (Figura b).



A banda em 1622 cm^{-1} mostra a vibração da configuração C=C do grupo aromático do rGO (Figura 23a), ainda observa-se uma baixa concentração de oxigênio em 1384 cm^{-1}, de vibrações de C-O do grupo epóxido e do grupo alcoxi e vibrações de deformação na banda de O-H em 3418 cm^{-1}. Na Figura 23b notamos diferentes picos presentes na amostra padrão, mostrando a diferença de grupos funcionais.

Apesar das inconsistências em vários resultados experimentais detalhados e hipóteses sobre o mecanismo de toxicidade, inúmeros relatos concordam que as propriedades físico-químicas, tais como grupos funcionais de superfície, cargas, revestimento, tamanho e defeitos estruturais (Yang et al., 2013), instabilidade química, composição química, modificação da superfície, dissolução das nanocompostos para liberar o excesso de íons metálicos livres, metais em estado redox, resíduos químicos derivados da síntese entre outros podem afetar o comportamento *in vivo* e sua toxicidade para o sistema (Li et al., 2014).

5.2 Análises Macroscópicas

Os animais foram pesados antes do início do tratamento e no final do experimento, tendo em média 193g e 212g, respectivamente (dados aqui não demonstrados). Os valores encontrados sugerem que os compostos não provocaram uma diminuição ou aumento anormal do peso no período observado, indicando que o NC isolado ou em associação com os quimioterápicos não interferiram no apetite dos animais tratados.

No momento da exposição da cavidade abdominal dos animais dos grupos Controle os animais apresentaram normais, enquanto no Grupo Câncer foi observado alterações macroscópicas como hidronefrose, em alguns casos rim com coloração anormal, hidroureter, foi relatado também hematúria nos animais. A hematúria é decorrente do CBNMI, sendo também relatada durante a indução dos animais.

No Grupo Controle e Câncer não foram observadas alterações macroscópicas no peritônio (Figura 24a). Contudo, nos animais do grupo Câncer+rGO observou-se a presença de aglomerados escuros no peritônio (Figura 24b), provavelmente decorrente da lenta absorção do composto rGO pelos vasos mesentéricos quando administrado i.p.

Nessa perspectiva, observa-se que estudos realizados por Chong et al. (2014) demonstraram que usando o PEG como polímero em animais com nanotubos de carbono, GO e rGO, os mesmos permanecem por mais de um mês no organismo quando administrado pela via i.p., levando a preocupação com a toxicidade, apesar de nenhuma toxicidade dos MBGs ser comprovada. Os mesmos autores relatam também que os animais não apresentaram danos aos órgãos principais, mas manchas escuras no fígado e baço, que diminuíram ao longo do tempo. O agregado observado pode levar a formação de trombo e posteriormente morte dos animais.

Nesse sentido, ressalta-se que estudos de Guo e Mei (2014) apontaram que a administração i.p. de GO- PEG levou a presença do nanomaterial no organismo do animal por três meses, evidenciando que o comportamento *in vivo* e a toxicologia do MBG depende da via de administração.

Entretanto, no presente estudo quando a CIS e/ ou DOXO foram dispersas com rGO, não foi observado tais aglomerados escuros no peritônio (Figura 24c), indicando maior absorção desses compostos pelos vasos mesentéricos.

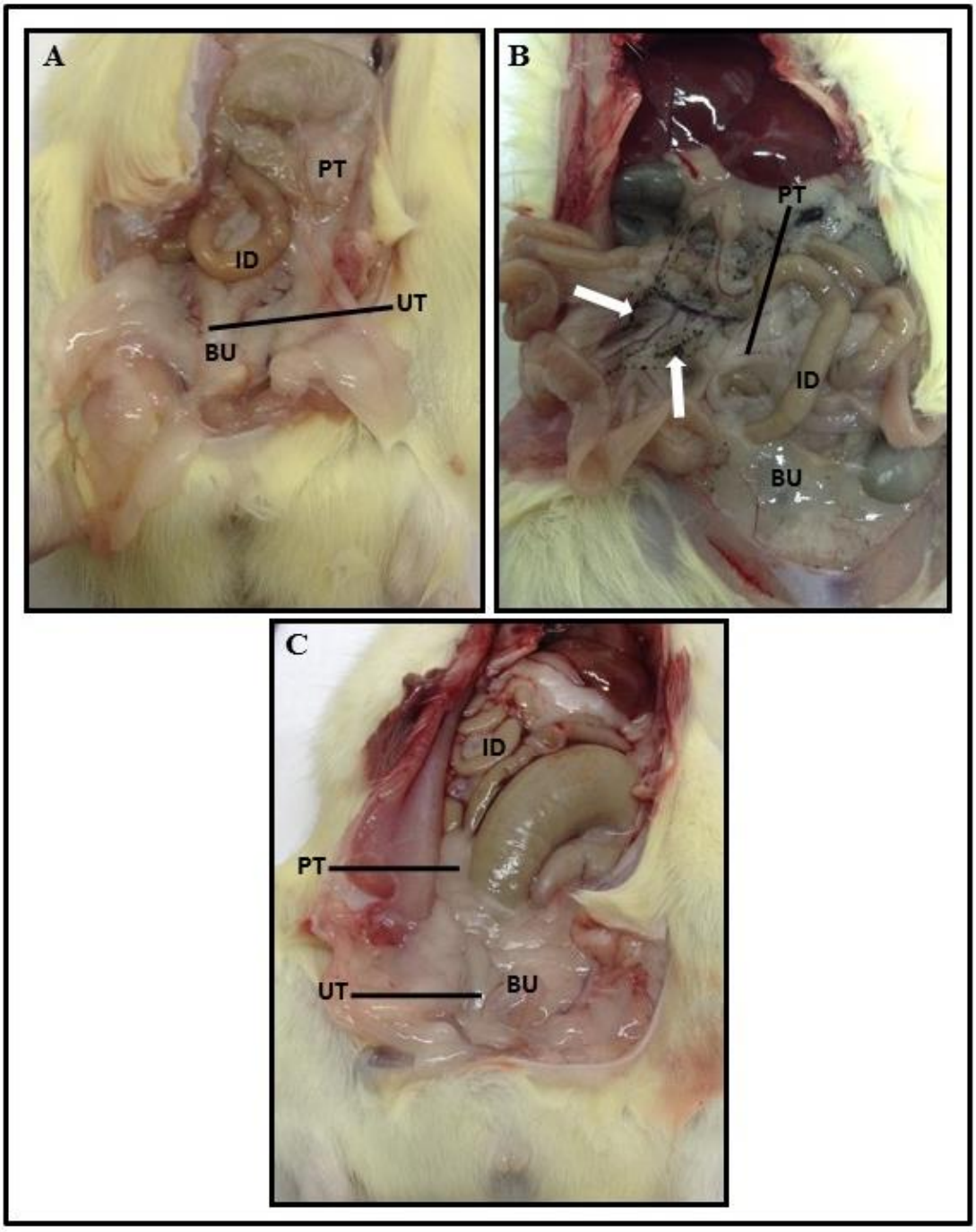
Tais afirmações vêm de encontro com Monopoli et al. (2012), onde os NCs adsorveram biomoléculas quando em contato com fluidos biológicos, e formaram a "corona" de biomoléculas reduzindo a energia de superfície das NCs e promovendo a

dispersão, constituindo um elemento importante de identificação dos mesmos. Estudos de Pino et al. (2014) caracterizam "proteína corona como o que a célula reconhece", sendo de alta importância, mas não a única característica biorrelevante dos NCs.

Mudanças de conformação das proteínas aderidas podem alterar o destino dos NCs (Fischer e Chan, 2007). Os estudos de Dakwar et al. (2014) mostram que a capacidade de nanomateriais conjugados com ligantes é perdida através da adsorção de uma proteína corona na sua superfície, assim a via de administração desempenha um papel importante, pois após a administração i.p. os NCs passam por interações com componentes sanguíneos que podem levar a alteração de estabilidade imunológica.

Para estes autores a estabilidade dos NCs no fluido i.p. é um fator importante para sua eficácia, pois pode levar a agregação ou a liberação prematura das partículas no fluído i.p. e diminuir o efeito biológico. O sistema de liberação controlada de NCs permite que uma quantidade constante de NCs esteja presente na cavidade i.p.. Uma taxa de liberação mais lenta pode ser atribuída a agregação das NCs para formações micrométricas no fluido i.p., a construção de grandes agregados de tamanho podem levar a um aumento da dificuldade de dissolução do fármaco no fluído i.p..

Figura 24: Imagens representativas da exposição da cavidade abdomino-pélvica dos animais dos Grupos Controle e Câncer (A), Câncer+rGO (B) e Câncer+rGO+CIS, Câncer+rGO+DOXO, Câncer+rGO+CIS+DOXO (C). (A) e (C) Aspectos normais das vísceras abdominais e peritônio. (B) Presença de aglomerados escuros (**setas**) no peritônio. A – C: **BU –** bexiga urinária, **ID –** intestino delgado, **PT –** peritônio, **UT –** útero.



5.3 Análises Histopatológicas

O sistema urinário do Grupo Controle (Grupo 1) não apresentou alterações estruturais microscópicas (Figuras 25a e 25b; Tabela 3). O urotélio normal foi composto por duas a três camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermediária, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (Figuras 25A e 25B).

Em contraste, o sistema urinário do Grupo Câncer (Grupo 2) apresentou drásticas alterações histopatológicas indicando que o modelo de indução foi efetivo, tais como: carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma urotelial papilífero de alto grau (pTa) e metaplasia escamosa queratinizante, foram encontrados em 60%, 20% e 20% dos animais, respectivamente (Figuras 25C e 25D; Tabela 3). O carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) foi caracterizado por células neoplásicas agrupadas em pequenos grupos ou cordões invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos aumentados. A metaplasia escamosa foi definida por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear. O pTa foi pontuado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos.

O pTa foi a alteração histopatológica mais frequente (60%), sendo desses 66,66% pTa de alto grau e 33,33% pTa invertido na bexiga urinária do Grupo Câncer+rGO (Grupo 3), sendo que 20% dos animais desse grupo apresentaram carcinoma *in situ* (pTis) (20%) e pT1 (20%) (Figura 25E; Tabela 3). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias nas células pontuadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes.

Similarmente, o Grupo Câncer+rGo+CIS (Grupo 4) apresentaram pTa, pTis e pT1 em 60%, 20% e 20% dos animais, respectivamente.Os animais diagnosticados com pTa apenas em 33,33% foi classificado como pTa de alto grau (Figura 25F; Tabela 3). Assim como o Grupo Câncer+rGO não mostrou ser tão efetivo.

As mais frequentes alterações histopatológicas do Grupo Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) foram: pTis (60%), neoplasia intraurotelial de baixo grau (20%) e pTa de alto grau (20%), demonstrando redução do padrão invasivo observado nos grupos Câncer+rGO e Câncer+rGO+CIS (Figura 25G; Tabela 3).

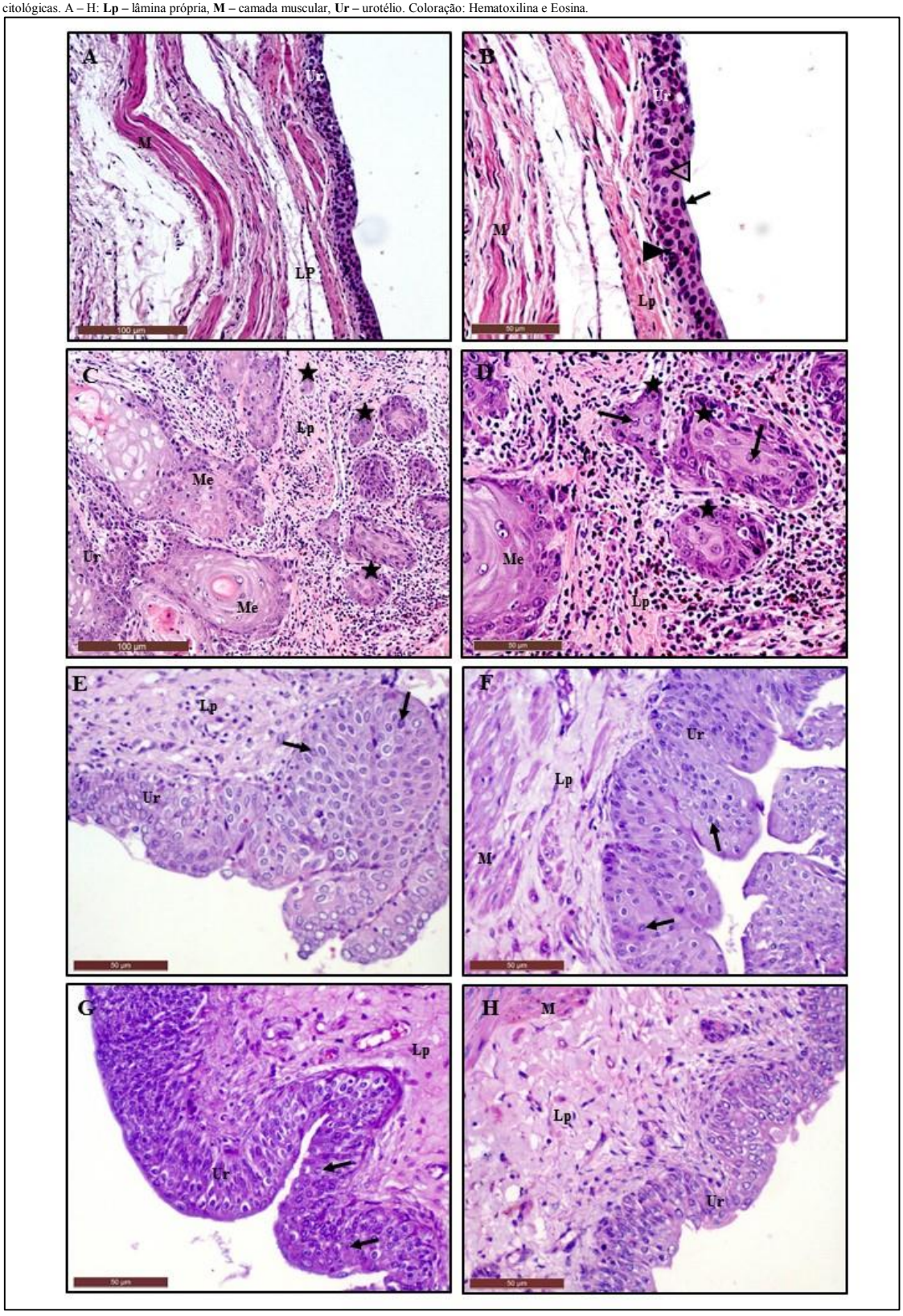
O grupo com a associação rGO+CIS+DOXO (Grupo 6) apresentou melhor resposta antitumoral no modelo de CBNMI quando comparado aos demais grupos experimentais, sendo que as lesões histopatológicas mais frequentes foram a hiperplasia plana (40%), neoplasia intraurotelial de baixo grau (20%), pTis (20%) e pTa (20%) (Figura 25H; Tabela 3**)**.

Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária de ratos dos grupos Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).

	Grupos					
Histopatologia	**Grupo 1 (*n*=5)**	**Grupo 2 (*n*=5)**	**Grupo 3 (*n*=5)**	**Grupo 4 (*n*=5)**	**Grupo 5 (*n*=5)**	**Grupo 6 (*n*=5)**
Normal	05 (100%)	-	-	-	-	-
Hiperplasia Plana	-	-	-	-	-	02 (40%)
Hiperplasia Papilífera	-	-	-	-	-	-
Neoplasia Intraurotelial de baixo grau	-	-	-	-	01 (20%)	01 (20%)
Neoplasia Intraurotelial de alto grau – Carcinoma *in situ* (pTis)	-	-	01 (20%)	01 (20%)	03 (60%)	01 (20%)
Carcinoma Urotelial Papilífero (pTa)	-	01 (20%)	03 (60%)	03 (60%)	01 (20%)	01 (20%)
Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	-	04 (60%)	01 (20%)	01 (20%)	-	-
Metaplasia Escamosa queratinizante	-	01 (20%)	-	-	-	-

Lesões Benignas: Hiperplasia Plana e Hiperplasia Papilífera; **Lesões Pré-malignas:** Neoplasia Intraurotelial de Baixo Grau; **Lesões Malignas:** pTis, pTa e pT1.

Figura 25: Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos Controle (A, B), Câncer (C, D), Câncer+rGO (E), Câncer+rGO+CIS (F), Câncer+rGO+DOXO (G) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (H). (A) e (B) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (cabeça Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos Controle (A, B), Câncer (C, D), Câncer+rGO (E), Câncer+rGO+CIS (F), Câncer+rGO+DOXO (G) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (H). (A) e (B) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**), uma camada intermediária de células (**cabeça de seta aberta**), e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**seta**). (C) e (D) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**estrelas**) invadindo a lâmina própria; figuras de mitose (setas); metaplasia escamosa (**Me**) associada ao carcinoma pT1. (E) e (F) Carcinoma urotelial papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com intensa atipia (**setas**), arranjo desordenado e com perda da polaridade. (G) Carcinoma in situ (pTis), caracterizado por atipia celular: núcleos volumosos (**setas**) com citoplasma reduzido e nucléolos proeminentes. (H) Hiperplasia plana composta por diversas camadas celulares no urotélio e ausência de atipias citológicas. A – H: **Lp –** lâmina própria, **M –** camada muscular, **Ur –** urotélio. Coloração: Hematoxilina e Eosina.



5.4 Testes bioquímicos

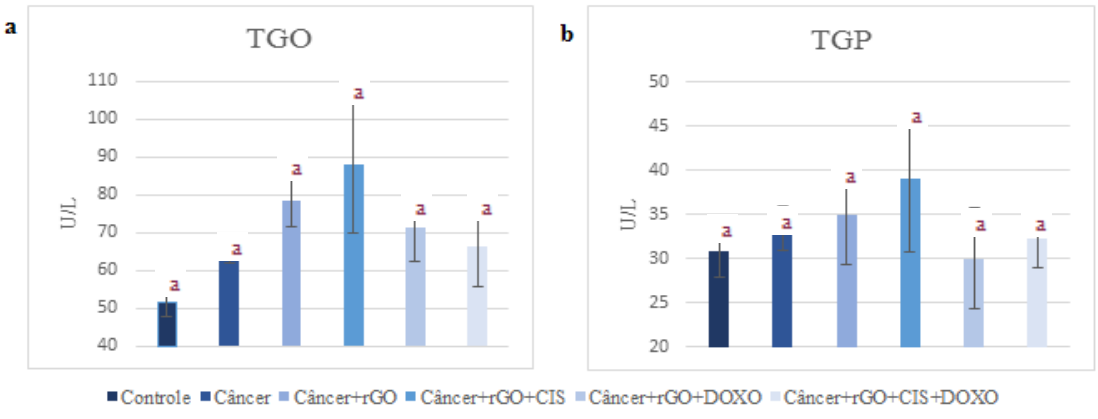
Os parâmetros bioquímicos realizados para determinar as funções hepática e renal foram: TGO, TGP, uréia e creatinina.

Os dados obtidos nas provas bioquímicas de função hepática através da avaliação das atividades séricas das enzimas hepáticas revelou que o Grupo controle apresentou valores 51,4 U/L de TGO e TGP 30,8 U/L; o Grupo Câncer uma elevação 65,0 U/L de TGO e TGP 33,4 U/L. Considerando a hepatotoxicidade dos quimioterápicos, foi observado nos animais submetidos aos tratamentos os seguintes resultados para TGO e TGP respectivamente: Grupo rGO 78,4 U/L e 35,0 U/L; Grupo rGO+Cis 88,2 U/L e 39,0 U/L; Grupo rGO +DOXO 71,4 U/L e 30,0 U/L; Grupo rGO+Cis+DOXO 66,4 U/L e 32,2 U/L.

Segundo os estudos de Ockner (2002) os valores de TGO e TGP são úteis para monitorar a evolução da hepatopatia parenquimal aguda ou crônica, sendo que TGP é habitualmente específico para doença hepatobiliar e TGO além do fígado está presente no músculo esquelético e coração. Conforme Motta (2003) o TGP é encontrado principalmente no citoplasma do hepatócito e o TGO na mitocôndria. Assim no dano hepatocelular leve a forma predominante no soro será o TGP e em lesões mais graves ocorre a liberação da enzima mitocondrial TGO.

Na Figura 26, verificou-se que valores de TGP não aumentaram significamente, entretanto os valores de TGO mostraram ser mais significativos e superiores ao Grupo Câncer, indicando danos mais graves devido aos quimioterápicos associados. No Grupo rGO+Cis+DOXO observou-se que o valor era menor em relação aos quimioterápicos isolados, mostrando que o rGO contornou o problema de toxicidade, contribuindo para minimizar o efeito hepatotóxico dos quimioterápicos em estudo.

Figura 26: Níveis de TGO em ratas Fischer 344 (a). Níveis de TGP em ratas Fischer 344 (b).



Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (*n= 05*).
Duas médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey.

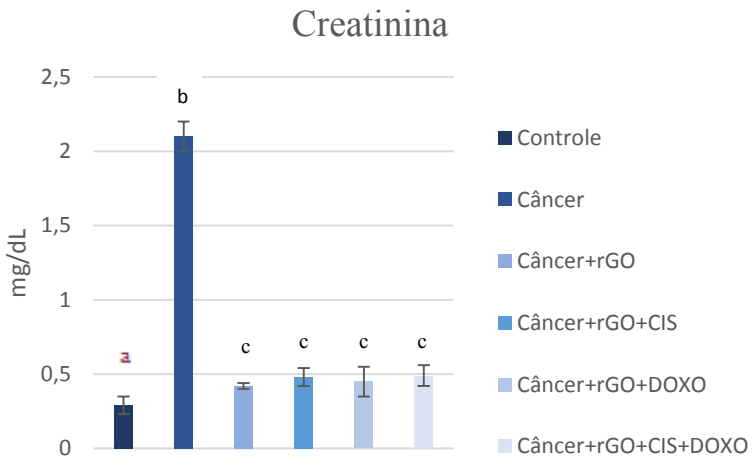
Vale ressaltar que a maioria dos fármacos passa por metabolização no fígado, através do efeito de primeira passagem. Essas substâncias podem se acumular no fígado, agredindo a metabolização de substâncias exógenas e endógenas, sendo assim um órgão alvo na avaliação de toxicidade pode levar a alterações funcionais e patológicas (Rang et al., 2007).

Os resultados encontrados na avaliação bioquímica para função renal revelaram que o Grupo controle apresentou valores 29,8 mg/dL e 0,29 mg/dL de uréia e creatina respectivamente; o Grupo Câncer uma elevação 86,8 mg/dL de uréia e creatina 2,10 mg/dL. Nos grupos tratados encontramos os seguintes resultados para uréia e creatina respectivamente: Grupo rGO 42,4 mg/dL e 0,42 mg/dL; Grupo rGO+Cis 62,0 mg/dL e 0,48 mg/dL; Grupo rGO +DOXO 52,0 mg/dL e 0,45 mg/dL; Grupo rGO+Cis+DOXO 45,0 mg/dL e 0,49 mg/dL.

Segundo Thrall (2007) a creatinina plasmática é derivada do catabolismo muscular, excreção exclusivamente renal, sendo que uma diminuição no fluxo renal causa acúmulo na corrente sanguínea, pois não é reabsorvida ou reaproveitada, indicando um déficit renal.

Em relação a creatinina, a Figura 27 demonstra que o Grupo Câncer diferiu estatisticamente de todos os grupos apresentando um aumento de creatinina, apontando que a filtração glomerular não manteve eficiente, característico de toxicidade renal provavelmente decorrente do MNU por ação direta e indireta. O Grupo Câncer+rGO não mostrou alteração da filtração glomerular. Na avaliação dos grupos tratados com a associação de quimioterápicos não foi observado diferença significativa, a filtração glomerular permaneceu eficiente mesmo sendo regularmente visualizada quando fármacos são utilizados.

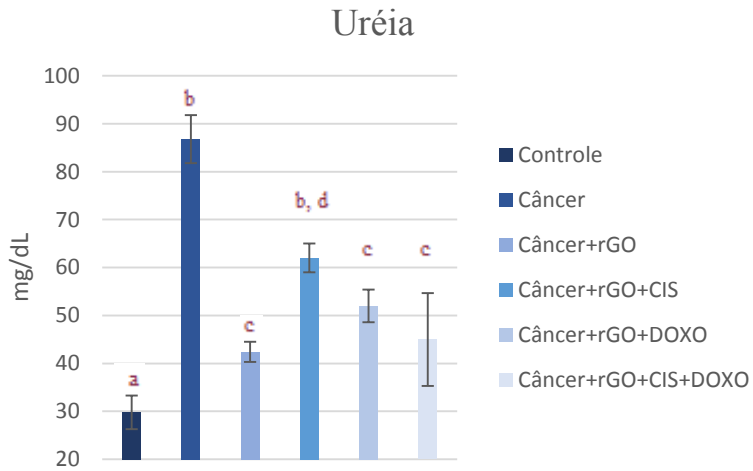
Figura 27: Níveis de creatinina em ratas Fischer 344.



Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (*n= 05*).
Duas médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Em relação a uréia, a Figura 28 mostra que o Grupo Câncer apresentou maiores valores, o que poderia ser um indicador de lesão renal, pois ela é eliminada pela urina, a diminuição do fluxo renal e da filtração glomerular são as causas de seu acúmulo na corrente sanguínea (Thrall, 2007; González e Scheffer, 2003). A alteração nos níveis de uréia é indicativo também de alterações no metabolismo proteíco, pois a uréia é o principal produto dos mesmos. Nos grupos tratados podemos observar um discreto aumento da uréia sérica, o que pode ser considerado um indício de nefrotoxicidade, apesar de ocorrer sem aumento da creatinina, visto que esta tem um aumento tardio na lesão renal quando comparada com a uréia, porém não prova nenhum efeito tóxico.

Figura 28: Níveis de uréia em ratas Fischer 344.



Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (*n= 05*).
Duas médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Segundo Abdel-Barry (2000) a avaliação de padrões bioquímicos avaliam o perfil metabólico dos animais submetidos à toxicidade além de poder indicar qual órgão, tecido e até mesmo qual metabolismo fisiológico está sofrendo alterações devido à agressão tóxica de substancias.

A avaliação da toxicidade consiste em uma etapa no estudo de desenvolvimento de fármacos. Para a avaliação da toxicidade os parâmetros de avaliação metabólica e morte são importantes e fornecem o perfil de toxicidade do fármaco testado (Hayes, 1994).

Estudos realizados por Kanz et al. (1998) relatam que as dosagens bioquímicas refletem o funcionamento fisiológico e possíveis alterações patológicas nos organismos. Assim, de acordo com Wang & Quinn (2002) os sistemas nanoestruturados apresentam

uma redução da distribuição dos fármacos nos tecidos-alvos, tais como rim, fígado e coração quando comparada com a forma farmacêutica convencional.

Saad et al. (2001) afirmam que ao reduzir a distribuição dos fármacos pelos sistemas nanoestruturados, estes influenciam fortemente a liberação e biodisponibilidade, minimizando os efeitos adversos. A capacidade de obter uma liberação prolongada diminui a toxicidade e aumenta a eficácia terapêutica do quimioterápico, permitindo a redução da dose administrada.

Assim, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os compostos nanoestruturados utilizados (rGO) e os quimioterápicos associados DOXO e CIS, apresentaram baixa toxicidade diante dos metabólitos utilizados. A avaliação bioquímica obtida vem de encontro ao observado em estudos de Guo e Mei (2014) no qual a avaliação bioquímica do sangue para função hepática e renal não mostrou variação nos marcadores, sendo assim sem danos nos órgãos.

5.5 Imunomarcação para NOX 1, Nrf2, PI3K, PTEN

O estudo *in vivo* baseado no modelo animal em rato para observação do CBNMI é viável devido a bexiga urinária do rato exibir características histológicas semelhantes com os tipos celulares dos seres humanos, diferenciando no fato de apresentarem três camadas de células, com perfis semelhantes de imunohistoquímica. Deste modo realizou-se a avaliação através da imunorreação de NOX 1, Nrf2, (Figura 29) PI3K e PTEN (Figura 30) para avaliar sua expressão frente aos tratamentos realizados (Tabela 4).

Na Figura 29A a 29F, verificou-se que NOX 1 foi intensamente marcado no tecido do grupo Câncer e de tratamento com rGO, rGO+CIS e rGO+DOXO indicando um fenótipo maligno e agressivo; no Grupo rGO+CIS+DOXO apresentou uma moderada imunoreatividade enquanto no Grupo controle a imunomarcação foi fraca.

Figura 29: Imunomarcação da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (A, G), Câncer (B, H), Câncer+rGO (C, I), Câncer+rGO+CIS (D, J), Câncer+rGO+DOXO (E, K) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (F, L). (A) Fraca imunomarcação para NOX1 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. (B), (C), (D), (E) Intensa imunomarcação para NOX1 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. (F) Moderada imunomarcação para NOX1 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. (G) Intensa imunomarcação para Nrf2 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. (H), (I), (J), (K) Fraca imunomarcação para Nrf2 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. (L) Moderada imunomarcação para Nrf2 (**asteriscos**) no citoplasma das células uroteliais. A – L: **LP –** lâmina próprria, **Ur –** urotélio.

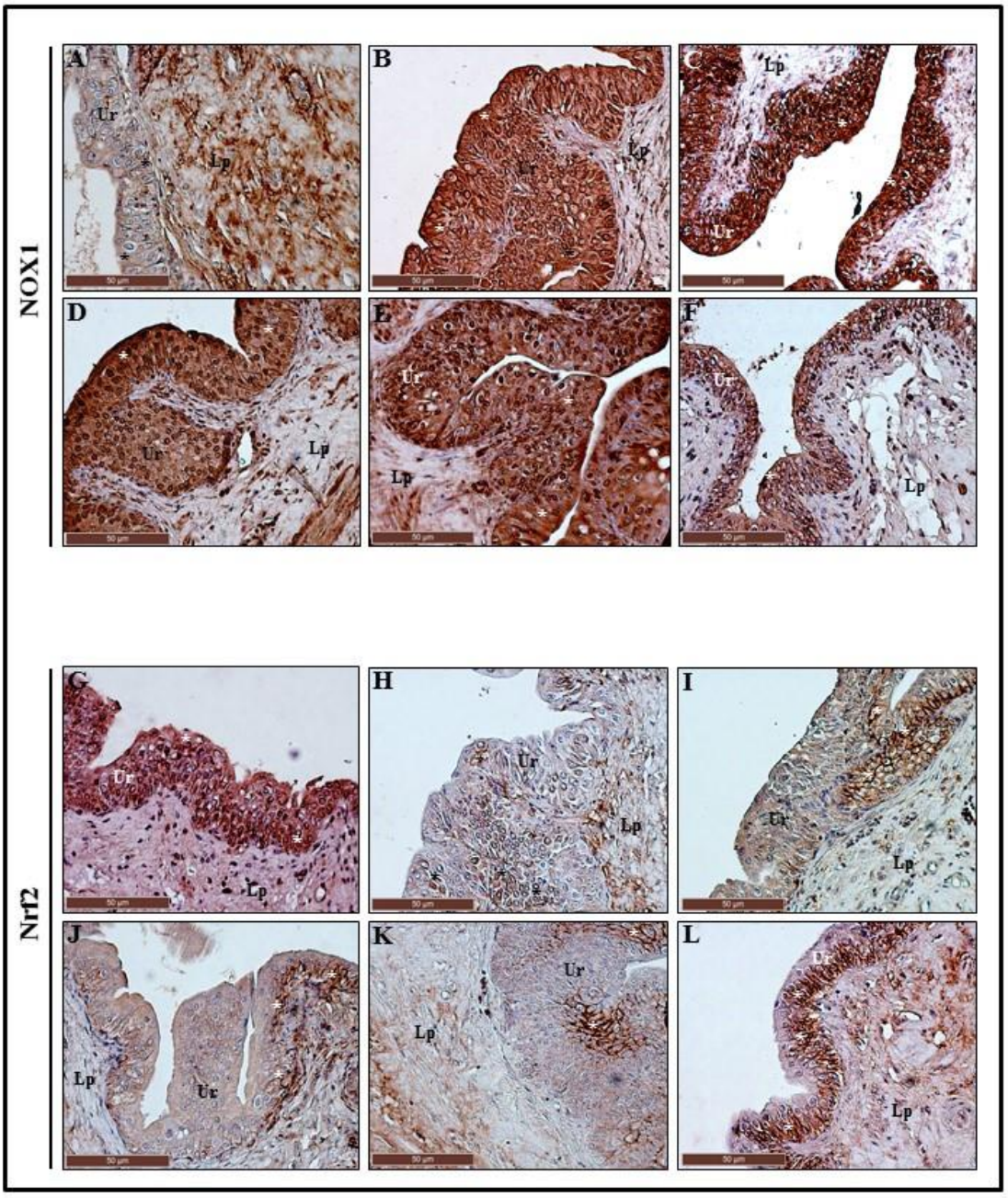


Figura 30: Imunomarcação da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (A, G), Câncer (B, H), Câncer+rGO (C, I), Câncer+rGO+CIS (D, J), Câncer+rGO+DOXO (E, K) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (F, L). (A) Imunomarcação para PI3K ausente no urotélio. (B), (C), (D), (E) Intensa imunomarcação para PI3K no citoplasma (**asteriscos**) e núcleo (**setas**) das células uroteliais. (F) Fraca imunomarcação para PI3K no citoplasma (**asteriscos**) e núcleo (**setas**) das células uroteliais. (G) Intensa imunomarcação para PTEN no citoplasma (**asteriscos**) e núcleo (**setas**) das células uroteliais. (H), (I), (J), (K) Fraca imunomarcação para PTEN no citoplasma (**asteriscos**) e núcleo (**setas**) das células uroteliais. (L) Moderada imunomarcação para PTEN no citoplasma (**asteriscos**) e núcleo (**setas**) das células uroteliais. A – L: **LP –** lâmina próprria, **Ur –** urotélio.

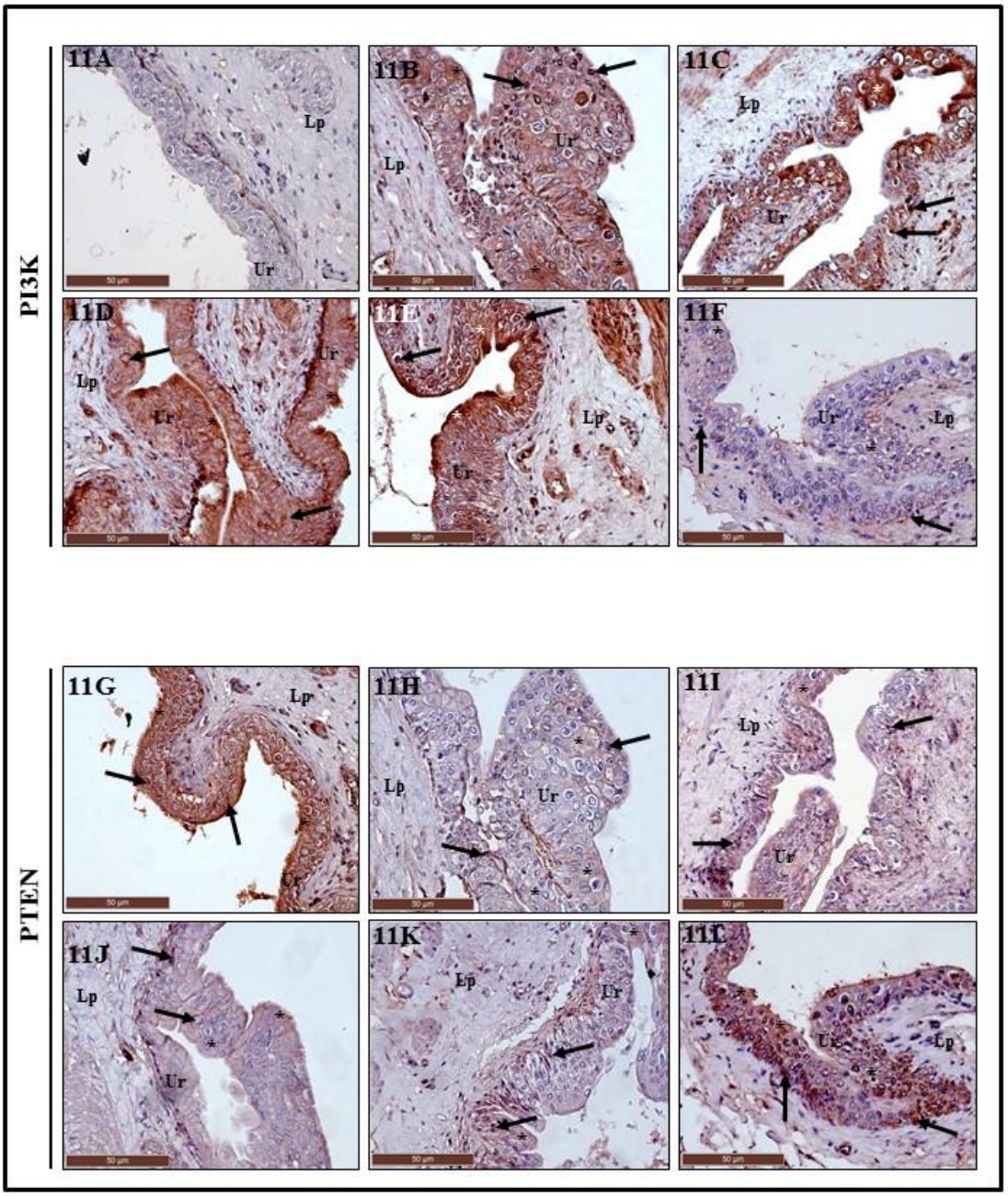


Tabela 4: Intensidade da imunomarcação para os diferentes antígenos na bexiga urinária dos grupos Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).

	Grupos					
Antígenos	**Grupo 1** (n= 5)	**Grupo 2** (n= 5)	**Grupo 3** (n= 5)	**Grupo 4** (n= 5)	**Grupo 5** (n= 5)	**Grupo 6** (n= 5)
PI3K	0 (0,0%)	3 (85,4%)*	3 (91,1%)*	3 (85,8%)*	3 (87,1%)*	1 (12,0%)*
PTEN	3 (90,2%)*	1 (5,7%)	1 (5,9%)	1 (6,8%)	1 (12,5%)	2 (62,7%)*
NOX1	1 (6,9%)*	3 (97,3%)	3 (91,2%)	3 (94,0%)	3 (98,1%)	2 (57,4%)*
Nrf2	3 (98,3%)*	1 (11,9%)	1 (27,5%)	1 (21,4%)	1 (18,0%)	2 (39,6%)*

0, ausência de reatividade; 1, fraca imunorreatividade (1% – 35% células uroteliais e/ou lamina própria e/ou células da camada muscular positivas); 2, moderada imunoreatividade (36% – 70% células uroteliais e/ou lamina própria e/ou células da camada muscular positivas); 3, intensa imunoreatividade (> 70% células uroteliais e/ou lâmina própria e/ou células da camada muscular positivas).

*Significância estatística (teste de proporção, $P<0.0001$).

Segundo Arnold et al. (2007) a enzima NOX 1 é intensamente marcada em mais de 80% dos tumores, essa intensa marcação promove a tumorgênese e angiogênese, atribuindo a efeitos dinâmicos de sinalização, incluindo reguladores chaves para transformação a fenótipo maligno. Quando a expressão de NOX 1 é expressiva as taxas de crescimento do tumor são elevadas e quando a expressão é baixa a taxa de crescimento é baixa.

Estudos realizados por Kim et al. (2010) e Wang e Choudhary (2011) apontam que as proteínas de NOX 1 são expressas em casos de CB de alto grau, tanto nos superficiais como nos invasivos, mas não nos de baixo grau e fenótipos não invasivos. Kim et al. (2010) e Shimada et al. (2011) afirmam que o monitoramento de NOX 1 induzido pela produção de EROs e a estimulação em células do CB altamente metastáticas contribui para o potencial de agressividade e invasividade das células, implicando no entendimento do mecanismo molecular e desenvolvimento do CB.

O aumento na produção de NOX 1 é essencial para formação intracelular de EROs, esta é essencial para ativação da caspase e indução da apoptose. Atualmente existem vários fármacos que induzem a morte celular mediada por EROs nas células CB, têm por base protocolos terapêuticos que utilizam de mecanismos mediados por EROs ou mesmo protocolos que induzem a produção de NOX 1, com a finalidade de aumentar a produção de EROs acima do limiar letal nas células malignas e permanecer abaixo do letal nas células normais (Wang e Choudhary, 2011).

De acordo com Afanas'ev (2011) o nível de EROs pode levar a efeitos positivos e negativos, sendo que pequenos níveis de EROs estimulam as células tumorais ao "pré-condicionamento"; aumento moderado de EROs facilita a transformação de células normais em cancerosas, estimulam a proliferação e sobrevivência das células neoplásicas; enquanto que em alta concentração induz a apoptose e morte celular.

O tratamento padrão de CB há mais de 30 anos na clínica é o uso do BCG, o qual possui um mecanismo de efeito antitumoral ainda desconhecido e sem marcadores para preverem sua resposta e quais pacientes responderão a terapia (Huang et al., 2012; Redelman-Sidi et al., 2013). A interação do BCG com células neoplásicas leva a internacionalização e processamento da micobactéria, permitindo a atividade antineoplásica mediada pelo mesmo (Huang et al., 2012).

A internacionalização do BCG nas células de CB atua como gerador de H_2O_2 intracelular, como resposta a infecção bacteriana, ativando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica nas células (Shah et al., 2014); e gerador de óxido nítrico sintase (iNOS), que contribuem para citotoxicidade celular e facilitam a resposta imunitária do hospedeiro, e óxido nítrico (NO), o qual contribui ainda mais para estresse oxidativo (Cadwell e Philips, 2013). Méndez-Samperio et al. (2010) apontam que a NADPH oxidase produto da geração intracelular de EROs desempenham um papel essencial na sinalização da regulação da secreção de enzimas induzidas por BCG, porém mais estudos são necessários.

Segundo Das et al. (2013) a citotoxicidade mediada por EROs é um dos principais mecanismos de ação do rGO devido: (1) concentração de malonaldeído; (2) fortes interações hidrofóbicas de rGO com a membrana celular; e de acordo com Chatterjee et al. (2014) (3) devido um eventual desarranjo pelas laterais do rGO. A citotoxicidade é reduzida com diminuição do grupo funcional oxigênio na superfície de rGO e o tamanho da folha.

A EROs geralmente é formada por causa da interação física e biológica (Chatterjee et al., 2014), o que pode ser confirmado pelo estudo de Das et al. (2013) no qual a internacionalização de GO e rGO nos microorganismos e culturas de células induz a formação de EROs através da interferência diretamente na cadeia transportadora de elétrons, acelerando a geração de EROs e fazendo necessária uma dispersão estável dos NCs.

A formação de EROs pode levar a uma diminuição do potencial de membrana, dano no DNA e apoptose quando em baixa dose, indicando que o estresse oxidativo é o principal mecanismo de citotoxicidade induzida por rGO. O caráter hidrofóbico, devido ao baixo teor de oxigênio da superfície de rGO, interfere na absorção e internacionalização pelas células (Chatterjee et al., 2014).

Segundo Roy et al. (2014) a geração de EROs pelas NCs pode provocar a modulação na resposta imune, na maioria das vezes EROs é manifestado por danos no DNA, oxidação de ácidos graxos polinsaturados em lipídeos e oxidação de aminoácidos em proteínas. A concentração intracelular de EROs se correlaciona com a viabilidade celular. NCs induzem a produção de EROs esgotando as enzimas antioxidantes e aumentando o teor de peroxidação lipídica e proteica. O estresse oxidativo é induzido pela inibição de Nrf2.

Em relação ao Nrf2, a Tabela 4 demonstra a presença de uma intensa imunorreatividade no Grupo Controle, moderada imunorreatividade no Grupo rGO+CIS+DOXO indicando um estímulo as proteínas de reaparo e fraca imunorreatividade nos demais grupos, Câncer, rGO, rGO+CIS e rGO+DOXO (Figura 29G a 29L).

Estudos realizados por Reszka et al. (2014) relatam que o CB induzido em roedores permitem observar a importância do Nrf2 na via de sinalização, pois esta via é o principal mecanismo que controla a expressão de genes de resposta antioxidante. O CB é caracterizado pelo aumento da expressão de Nrf2 em comparação com tecidos normais. Slocum & Kensler (2011) e Reszka et al. (2014) relatam que Nrf2 protege a célula contra agentes carcinógenos, pela desintoxicação de xenobióticos e materiais tóxicos, pelo seu efeito citoprotetor, Reszka et al. (2014) podendo influenciar diretamente no processo da carcinogênese de células epitelias da bexiga urinária.

Soini et al. (2011) afirmam que o Nrf2 pode ser desregulado em uma série de CB expressando baixa positividade nuclear, enquanto a positividade citoplasmática está relacionada com KEAP1 (proteína proteassomal independente de ubiquitina).

Cheng et al. (2013) e Shah et al. (2014) mencionam que o BCG induz a sinalização de múltiplas vias de sinalização que são sensíveis ao estresse oxidativo, como a sinalização de Nrf2. Com base em Soini et al. (2011) e Cadwell e Philips (2013) os bacilos após serem fagocitados podem escapar para o citosol e serem reconhecidos pela proteína p62, quando esta proteína está em excesso ela se liga ao KEAP1, deslocando Nrf2 do citoplasma para o núcleo.

A indução de Nrf2 é uma estratégia eficaz e suficiente para obter proteção contra a carcinogênese. O Nrf2 é o regulador mestre de enzimas e sua ativação em vários tecidos, incluindo a bexiga urinaria, está associada com a inibição da carcinogênese. Na bexiga a indução de enzimas e a ativação do Nrf2 sugere que ocorrem exclusivamente pelo epitélio, o que é de suma importância considerando que quase todos os tumores desenvolvem a partir do epitélio (Paonessa et al., 2009).

Entretanto, estudos de Namani et al. (2014) apontam que além da via Nrf2 apresentar papel crucial na quimioprevenção do câncer e supressão tumoral em células normais, desempenha também função importante na tumorigênese e proteção tumoral, desempenhando atribuições paradoxais, conhecido como o "lado escuro do Nrf2". Quando é intensamente expressado nas células tumorais leva a maior resistência aos quimioterápicos, como CIS e DOXO.

Estudos realizados por Slocum e Kensler (2011) e Reszka et al. (2014) relatam que a resistência de fármacos devido ao aumento da sinalização deve-se ao aumento dos níveis de enzimas de proteção, permitindo avanços ao tumor e levando a resistência de fármacos. Muitos dos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos pode ser anulado pelas células tumorais pelo aumento de Nrf2, gerando assim um tumor mais agressivo para o crescimento e disseminação e ainda com maior capacidade para não ser tratado com a terapia.

As células têm programas adaptativos e dinâmicos para criar balanço entre a produção e remoção de EROs, sendo que Nrf2 é o regulador desse balanço. NCs que suprimem Nrf2 levam a uma depleção antioxidante e a inibição de enzimas antioxidantes (Roy et al., 2014).

Em concordância com os estudos de Namani et al. (2014), os resultados de Reszka et al. (2014) revelaram também alta expressividade de Nrf2 em células normais da bexiga urinária e em células tumorais, assim o papel do fator de transcrição Nrf2 na etiologia do câncer, desenvolvimento e tratamento ainda é ambíguo e requer mais pesquisas.

O presente estudo mostrou no Grupo Controle e rGO+CIS+DOXO intensa e moderada imunorreatividade, respectivamente, desempenhando papel essencial na prevenção da carcinogênese, concordando com os estudos de Paonessa et al. (2009). Nos Grupos do NC associado aos quimioterápicos o fato de não apresentarem intensa imunorreatividade indica que as células não possuem resistência ao tratamento, condizente com os estudos de Namani et al. (2014), Reszka et al. (2014) e Slocum e Kensler (2011).

Em relação ao PTEN, a Tabela 4 mostra a presença de uma intensa marcação no tecido normal e no grupo tratado com rGO+CIS+DOXO a marcação foi moderada indicando uma tendência de recuperação do tecido, enquanto que os tecidos do Grupo Câncer e de tratamento com rGO, rGO+CIS e rGO+DOXO foram fracamente marcados indicando que PTEN encontra-se reprimido (Figura 30G a 30L).

Korkolopoulou et al. (2012) citam que PTEN é executor da inibição da via de sinalização e desregulamentação em quase um terço dos carcinomas uroteliais, sendo associado com a sobrevida do paciente. Segundo Lu et al. (2012) a expressão de PTEN está correlacionado com a patologia clínica do CB.

Segundo estudos realizados por Sfakianos et al. (2014) quando todos os elementos de PTEN/PI3K/Akt estão em equilíbrio, regulam o crescimento celular, proliferação e sobrevivência. A perda de PTEN está associada com aumento do grau de estadiamento do tumor e a baixa intensidade de imunomarcação é associada com progressão para os casos de invasão. Foi observado ainda que pacientes com recorrência em 12 meses apresentam fraca ou nenhuma imunomarcação para PTEN. De acordo com os estudos de Lu et al. (2012) a diminuição da expressão de PTEN durante o processo carcinogênico diminui a via de regulação da sinalização de PI3K, resultando na sua marcação acentuada.

Avanços na compreensão da biologia do tumor tem estabelecido um papel crítico na terapia para várias doenças malignas, incluindo as geniturinárias. Os sinais anti-apoptóticos que promovem a sobrevivência celular é proposta como estratégia para melhorar a eficácia dos agentes quimioterápicos convencionais. A inativação por mutação ou deleções de PTEN levam a ativação da via PI3K/Akt/mTOR (Moon et al., 2014).

De acordo com Redelman-Sidi et al.(2013) as vias que determinam a absorção de BCG nas células neoplásicas são PTEN/PI3K, Ras e Cdc42-Rac1-Pak1 conhecidas por estarem interligadas. Huang et al. (2012) comentam que a interação das células neoplásicas e BCG depende da ativação da via PI3K/Akt, indicando a perda de PTEN.

A terapia com BCG será eficaz em pacientes que apresentam uma diminuição da expressão de PTEN, mutações ativadoras e Ras ou Pak1, sendo que a biomarcação de Ras e PTEN podem ser indicativos da eficácia de BCG. Méndez-Samperio et al.(2010) citam que BCG ativa a via PI3K/Akt devido a fagocitose de macrófagos de micobactérias, sendo assim a atividade de PI3K é necessária para BCG.

A Tabela 4 e a Figura 30A a 30F mostra que em relação a imunomarcação para o antígeno PI3K, a presença de uma intensa imunorreatividade nos Grupos Câncer, rGO, rGO+CIS e rGO+DOXO, fraca imunorreatividade no Grupo rGO+CIS+DOXO indicando uma tendência de recuperação do tecido e ausência de imunoreatividade no Grupo Controle.

Segundo estudos de Castillo-Martin et al. (2010), as mutações pontuais em PI3K foram observados em até 10% dos casos de pTa de baixo grau, sendo que o produto codificado pela PI3K é crítico na indução da via de sinalização PTEN/ Akt. O mesmo autor ainda relata que PI3K tem efeito oncogênico cooperativo desde que um subconjunto de tumores superficiais papilares abriguem mutações nesse gene, indicando uma associação com a progressão tumoral inicial. De acordo com Sfakianos et al., (2014) os pacientes de CB que adquirem anormalidades na via PI3K/Akt estão associados com um fenótipo mais agressivo e piores taxas de sobrevivência.

As alterações no CB resultam na ativação anormal de sinalização a partir de receptores tirosina-quinase e/ou perda do controle do ciclo celular (Ohgaki & Kleihues, 2009) caso da via PI3K/Akt, onde o tumor passa a desenvolver a capacidade de expressar seus próprios fatores de crescimento ou super expressar seus respectivos receptores. Disso decorre na possibilidade de estimulação autócrina, levando a superativação das mesmas e promoção do crescimento, proliferação e sobrevivência das células malignas (Nieto-Sampedro et al., 2011; Cerniglia et al., 2012; Moon et al., 2014). As vias acima citadas são importantes para alvos moleculares nas intervenções terapêuticas (Nieto-Sampedro et al. 2011).

De acordo com os estudos de Korkolopoulou et al. (2012), a imunorreatividade do PI3K foi citoplasmática e nuclear mostrando ser maior em células uroteliais neoplásicas devido ao aumento da regulação da via na sinalização tumoral urotelial, aparecendo no estádio inicial e sendo sustentado pelo processo neoplásico sem distinção nos casos de estádio de baixo ou alto grau. O urotélio normal apresentou baixa expressão em comparação com as células dos animais com carcinoma urotelial.

Em concordância com as pesquisas de Korkolopoulou et al. (2012), os resultados encontrados no presente estudo mostraram a presença de imunorreatividade citoplasmática e nuclear em todos os grupos, com exceção do Grupo Controle, o apresentou ausência de imunorreatividade.

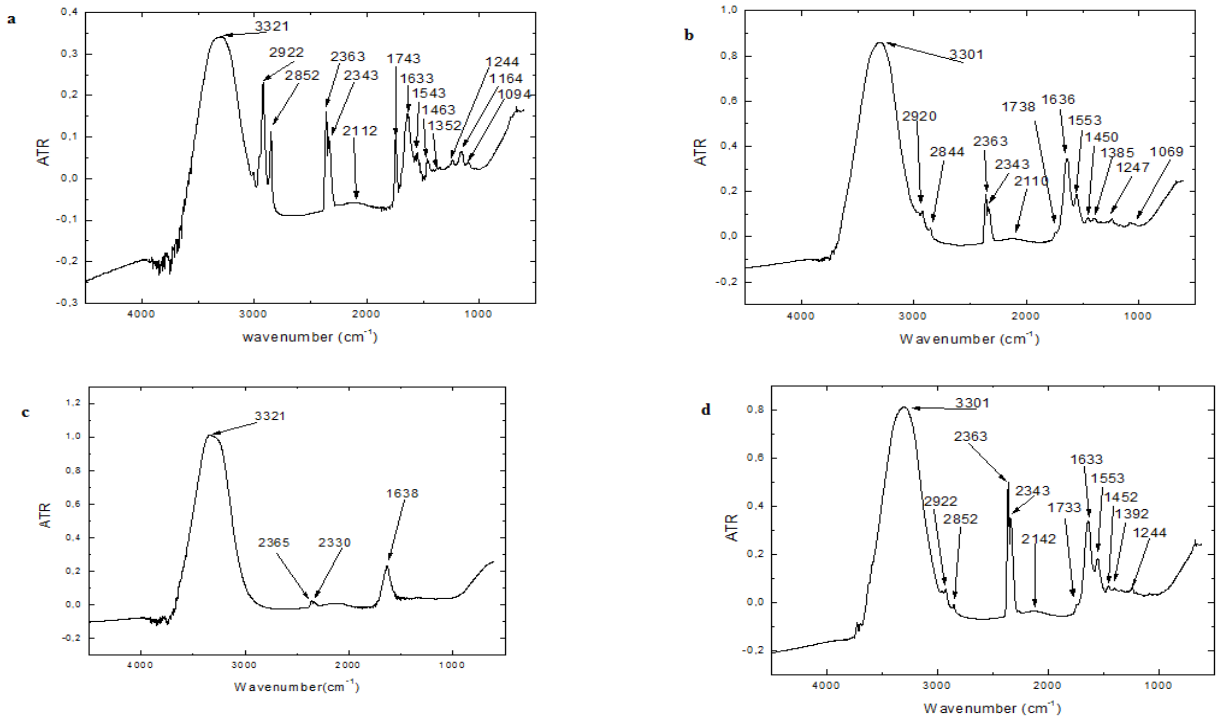
Segundo Roy et al. (2014) a ativação inicial de PI3K sob condições de estresse pode aumentar a produção de EROs, assim uma diminuição da expressão na via PI3/Akt/mTOR favorece a autofagia e simultaneamente apoptose, portanto NCs que induzem o estresse oxidativo em macrófagos induzem a autofagia.

A inibição de PI3K/Akt/mTOR tem sido proposta como complemento à quimioterapia com cisplatina e radiação levando a morte celular por autofagia (Claerhout et al., 2010).

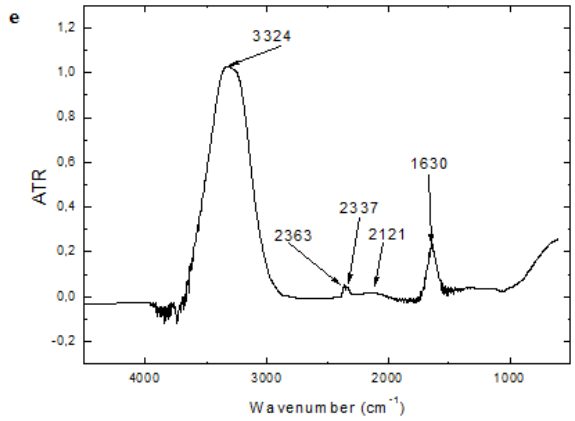
5.6 Medição do espectro Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)

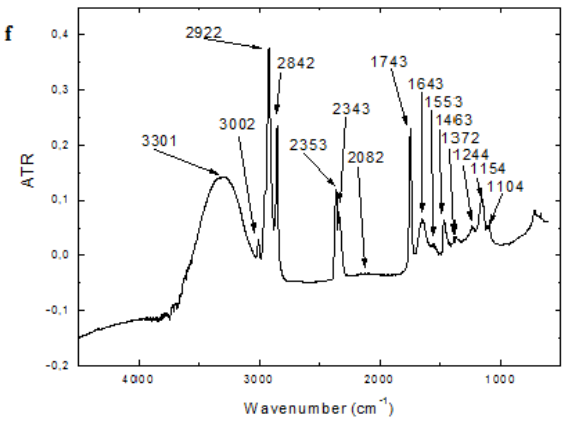
Foi considerado as bexigas com lesões mais representativas dos grupos de animais e as dispersões para o tratamento a que foram sumetidos levaram aos seguintes espectros (Figura 31). A partir dos espectros podemos obter a tabela com os picos identificados (Tabela 5).

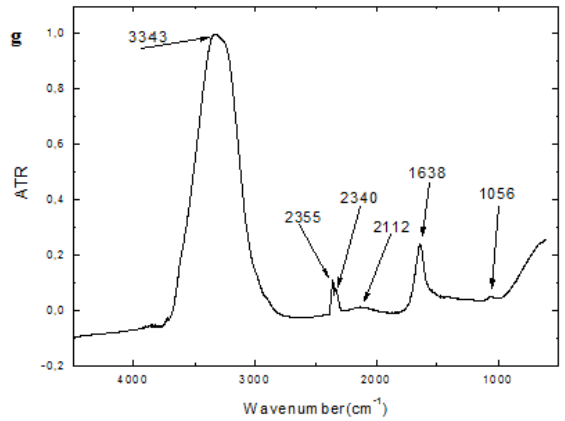
Figura 31: Espectro típico de absorção do infravermelho Transformada de Fourier das bexigas dos grupos de estudo em análise, e as formulações a que cada grupo de tratamento foi submetido com suas bandas determinadas. Controle (a), Câncer (b), formulação de rGo (c), grupo tratado com rGO (d), formulação de rGo+Cis (e), grupo tratado com rGO+Cis (f), formulação de rGo+Doxo (g), grupo tratado com rGO+Doxo (h), formulação de rGo+Cis+Doxo (i), grupo tratado com rGO+Cis+Doxo (j).

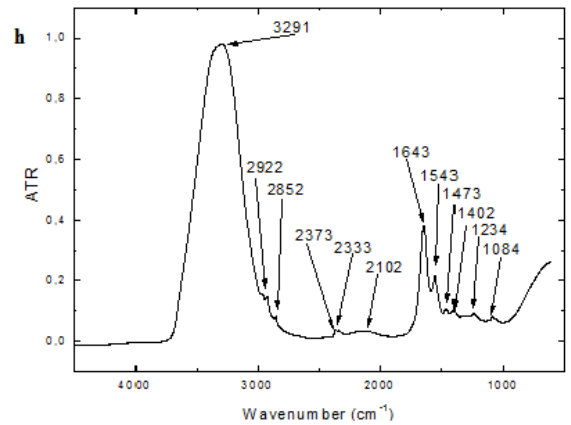


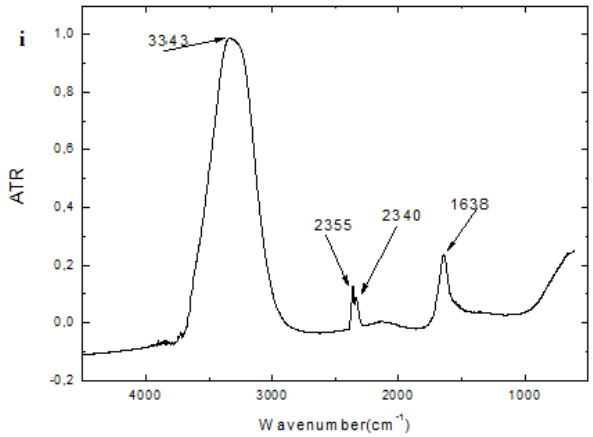
...Cont.


e
ATR
Wavenumber (cm-1)
3324
2363
2337
2121
1630


f
ATR
Wavenumber (cm-1)
2922
2842
1743
1643
1553
1463
1372
1244
1154
1104
3301
3002
2353
2343
2082


g
ATR
Wavenumber(cm-1)
3343
2355
2340
2112
1638
1056


h
ATR
Wavenumber (cm-1)
3291
2922
2852
1643
1543
1473
1402
1234
1084
2373
2333
2102


i
ATR
Wavenumber(cm-1)
3343
2355
2340
1638

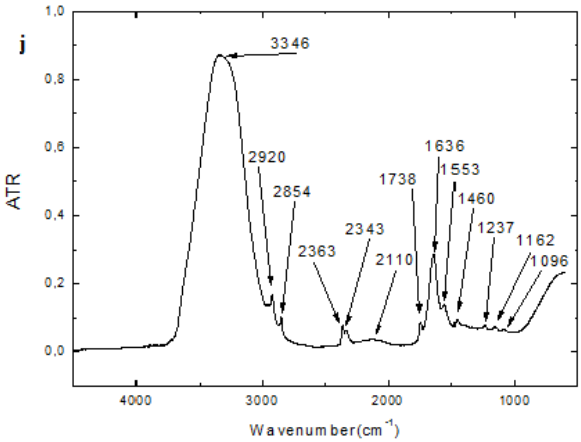

j
ATR
Wavenumber(cm-1)
3346
2920
2854
1738
1636
1553
1460
1237
1162
1096
2363
2343
2110

Tabela 5: Análise do espectro de FTIR das bexigas urinárias Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).

Comprimento de onda (cm^{-1})						Atribuições do pico	Ref
Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**	**Grupo 5**	**Grupo 6**		
					3346	Composto	
3321						Banda NH	1
	3301	3301	3301			Banda amida A	1
				3291		Amida A (alongamento N-H)	1
			3002			Anel de C-H; Vibrações de alongamento de CH (permanece inalterada pela substituição de de metoxi e hidroxil)	1
2922	2920	2922	2922	2922	2920	Vibração de alongamento assimétrico de CH_2 das Cadeias de acil (lipídios)	1
2852		2852		2852	2854	Vibração de alongamento simétrico de CH_2 das Cadeias de acil (lipídios)	1
	2844		2842			Alongamento simétrico do metoxi	1
				2373		*	
2363	2363	2363			2363	*	
			2353			*	
2343	2343	2343	2343		2343	*	
				2333		*	
		2142				*	
2112	2110				2110	*	
				2102		Combinação de uma rotação prejudicada e ligação de O-H (água)	1
			2082			*	
1743			1743			Modo de alongamento do C=O dos lipídios	1
	1738				1738	Modo de alongamento do C=O dos lipídios	1
		1733				Banda de ester de ácido graxo	1
			1643	1643		Composto Banda de Amida I (devido as vibrações de alongamento de C=O	1
1633	1636	1633			1636	CompostoAlongamento do C-C do anel fenil	1

Cont...

Comprimento de onda (cm^{-1})						Atribuições do pico	Ref
	1553	1553	1553		1553	Alongamento CO; Folha-α da amida II (banda de amida II principalmente força do alongamento de C-N e vibrações fracas de ligações de C-N-H ligado ao alongamento de C=O	1
1543				1543		Amida II	1
				1473		Ligação de CH_2 de cadeias de metileno em lipídeos	1
1463			1463		1460	Modo de quebra CH_2 da cadeia de acil (fosfolipídeo)	1
		1452				Banda de proteínas; Metoxil em forma de guarda chuva;Forma de ligação de C-H de proteínas estruturais	1
	1450					Deformação do metileno em biomoléculas	1
				1402		Ligações simétricas de CH_3 de grupos de metil de proteínas	1
		1392				Particula de C	1
	1385					Alongamento C-O, deformação de C-H, deformação de N-H	1
			1372			Alongamneto de citosina C-N, guanina	1
1352						*	
	1247					Colágeno I e IV;Alongamento assimétrico do fosfato	1
1244		1244	1244			Colágeno I e IV; Alongamento assimétrico do fosfato	1
					1237	Composto de amida III e vibração do fosfato de ácidos nucleicos	1
				1234		Composto de amida III assim como vibração fosfato de ácidos nucleicos	1
1164					1162	Modo de alongamento principalmente de C-O dos grupos de C-OH de serina, threosine, e proteínas tirosina	1
			1154			Vibrações de alongamento de ligações de hidrogênio de grupos C-OH	1
			1104			Alongamento simétrico de P-O-C	1
1094					1096	Alongamento simétrico PO^-_2 (fosfato II)	1
				1084		DNA (banda devido a vibrações de PO^-_2; Alongamento simétrico do fosfato; Absorbância por ligações fosfodiester de fosfato/ cadeias de açúcar de ácidos nucléicos; Região de ácido nucléico; Banda de fosfato ácido nucleíco	1
	1069					Característica de tecido maligno	2

* Não foi encontrado pico na literatura

[1]Movasaghi et al (2008)

[2]Mehrotra et al. (2010)

Estudos realizados por Caiene et al. (2012) relatam que a utilização de espectroscopia de infravermelho (IV) na determinação bioquímica e estrutural de tecidos sem a utilização de corantes ou outros agentes de contraste era utilizada desde os anos de 1940. Esta técnica permitiu a investigação de macromoléculas químicas associadas a patologia que se manifestam através de alterações químicas no tecido. Essas alterações seriam refletidas no espectro de IV com alterações nas formas e intensidade de grupos funcionais específicos das macromoléculas. As amostras biológicas são complexos abundantes de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, assim os espectros no IV contém bandas de absorção fundamentado no modo vibracional destes complexos.

A análise da frequência de grupos característicos do tecido permitem uma estimativa qualitativa da sua composição química. Dentre as características biomoleculares o estado conformacional, o comprimento da cadeia lateral e as ligações inter e intra cadeias são características que podem ser avaliadas. A técnica do espectro Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) tem sido bastante utilizada no campo do câncer na compreensão da biologia do tumor. As diferenças observadas nos tecidos controle, câncer e os grupos tratados refletem no espectro mudanças em relação aos ácidos nucleícos, lipídeos e proteínas, com a presença de novas proteínas e mudanças na sua conformação e composição (Mehrotra et al., 2010).

Foi observado uma banda em 3346 no grupo rGO+CIS+DOXO, a mesma foi encontrada na dispersão deste composto, indicando que tal banda é característica da dispersão de tratamento.

O controle apresentou banda em 3321 cm^{-1} característico de banda NH associado a aminas secundárias, o qual aparece deslocado nos grupos câncer, rGO, rGO+CIS em 3301 cm^{-1}, o deslocamento observado é indicativo de alteração na estrutura das proteínas, enquanto no grupo rGO+DOXO a banda referente a amida A apresenta um alongamento em N-H, indicando uma tendência de recuperação do tecido, isso porque a banda de amida A é característica de tecidos normais.

Caine et al. (2012) identificaram que as bandas entre 3050 e 2800cm^{-1} tratam-se de uma região dominada por absorções de alongamento simétrico e assimétrico da ligação C-H do metil, metileno e metino, grupos funcionais comuns em ácido graxos. No estudo realizado, observamos banda carbonil-éster em 1725-1745cm^{-1} que pode ser característica do órgão quando rica em lipídeos. Nesse sentido, notamos que em todos os grupos em discussão, com exceção do grupo rGo+DOXO, foram encontradas as bandas referidas, indicando uma reestruturação dos fosfolipídios do urotélio.

Glassford et al. (2013) apontam que utilizando o FTIR podemos ainda obter informações sobre a estrutura e o comportamento de proteínas, onde existem 5 bandas características, sendo três conhecidas como a bandas de amida, as mais usadas em estudos de IV. A banda de amido I possui a absorção mais forte no IV com comprimentos de onda entre 1600 e 1700 cm^{-1}, aparece devido vibrações de alongamento de C=O juntamente com alongamento fraco de C-N e ligações de N-H, já a banda de amido II ocorre nas bandas de 1500 a 1600 cm^{-1} é derivada principalmente do alongamento da ligação de C-N com o plano de ligação de N-H, a banda de amido III possui comprimento de onda de 12000 a 13000 cm^{-1}, sendo que a vibração devem-se ao complexo de ligação com N-H e o alongamento de N-H.

A banda de amida I, amida II e amida III foram encontradas respectivamente nos grupos tratados com rGO+CIS e rGO+DOXO, em todos os grupos e no grupo de rGO+DOXO e rGO+DOXO+CIS. As três bandas de amida são responsáveis pela elucidação da estrutura secundária da proteína, sendo que a amida I é mais sensível as mudanças estruturais devido a ligação de hidrogênio e a mais usada em análise da estrutura secundária de proteína. (Mehrotra et al., 2010).

No grupo Câncer podemos encontrar pico no comprimento de onda ~1380cm^{-1}. De acordo com estudos de Caine et al. (2012), esse comprimento de onda corresponde a vibração de ligação simétrica de lipídeos e proteínas entre as bandas de amida II e amida III. Um pico em 1473 cm^{-1} no grupo rGO+DOXO representa uma ligação de cadeia de metileno em lipídeos, indicando uma reestruturação dos fosfolipídios do urotélio.

As bandas vibracionais de amida I aparecem principalmente devido as vibrações de alongamento de C=O do grupo amida da cadeia de proteínas, caracterizada pela estrutura secundária da proteína em forma de α-hélice. Já as bandas em 1543 cm^{-1} e 1554 cm^{-1} de ligações de N-H vibracionais de amida são atribuídas a estrutura secundária de folha-β de proteínas, sendo uma região sensível a mudanças da geometria molecular e ligações de hidrogênio de grupos peptídeos. A característica de folha-β em tecidos malignos, pode ser atribuído a conversão de alfa a beta na estrutura secundária de proteínas em tecido carcinomatoso (Mehrotra et al., 2010).

Os mesmos autores relatam que a perda do perfil proteico indica uma diversificação de função durante um processo neoplásico, o que vêm de encontro as alterações observadas nos espectros no atual estudo.

Bandas em 1402 cm^{-1} no grupo rGO+DOXO e 1452 cm^{-1} no grupo rGO indicam alterações que correspondem a ligação de proteínas devido a exposição aos respectivos tratamentos, apontando uma reestruturação das proteínas que compõe o tecido.

Uma banda em 1392 cm^{-1} no grupo rGO é caracterizada por ser de uma partícula de carbono o que pode significar não ser necessariamente atribuído ao composto, haja vista que o rGO possui bandas características em 1350 e em 1580 cm^{-1} como caracterizado no item 5.1.6 e mascarado ao realizar a dispersão em Pluronic F68.

No presente estudo foram encontrados comprimentos de onda abaixo de 1300 cm^{-1} no grupo rGO+DOXO. Caine et al. (2012) citam que esses picos em comprimentos de onda abaixo de 1300 cm^{-1} devem-se a alongamentos de grupos fosfodiéster encontrados no DNA, RNA e fosfolipídeos; sendo que se o alongamento for simétrico ~1235 cm^{-1}, se assimétrico ~1080 cm^{-1}, cuja hipótese deve-se a utilização da Doxo no tratamento dos animais, isso porque a mesma se liga ao DNA e inibe a síntese de ácido nucléico.

De acordo com Mehrotra et al. (2010), a observação de bandas na região de 1238 cm^{-1} é característica do alongamento assimétrico de grupos fosfodiéster encontrado nos ácidos nucléicos. Bandas na região de 1084 deve-se a interações no DNA devido a vibrações de fosfato, alongamento simétrico por ligações de fosfodiéster. Bandas na região de 1104 cm^{-1} devem-se ao alongamento de da ligação P-O-C.

No presente estudo a banda 1238 cm^{-1} foi identificada no grupo rGO+CIS+DOXO; banda em 1084cm^{-1} no grupo rGO+DOXO e banda 1104 cm^{-1} no grupo rGO+CIS, indicando a ação dos quimioterápicos nos ácidos nucleicos das células neoplásicas.

No grupo Câncer foi observado um pico em 1069 cm^{-1}, o qual de acordo com estudos realizados por Mehrotra et al. (2010) é característico de tecidos malignos.

A diferença de vibração simétrica ou assimétrica das vibrações de fosfato indica uma elevada quantidade de DNA em tecido maligno causada pela intensa atividade proliferativa nas células cancerosas (Mehrotra et al., 2010).

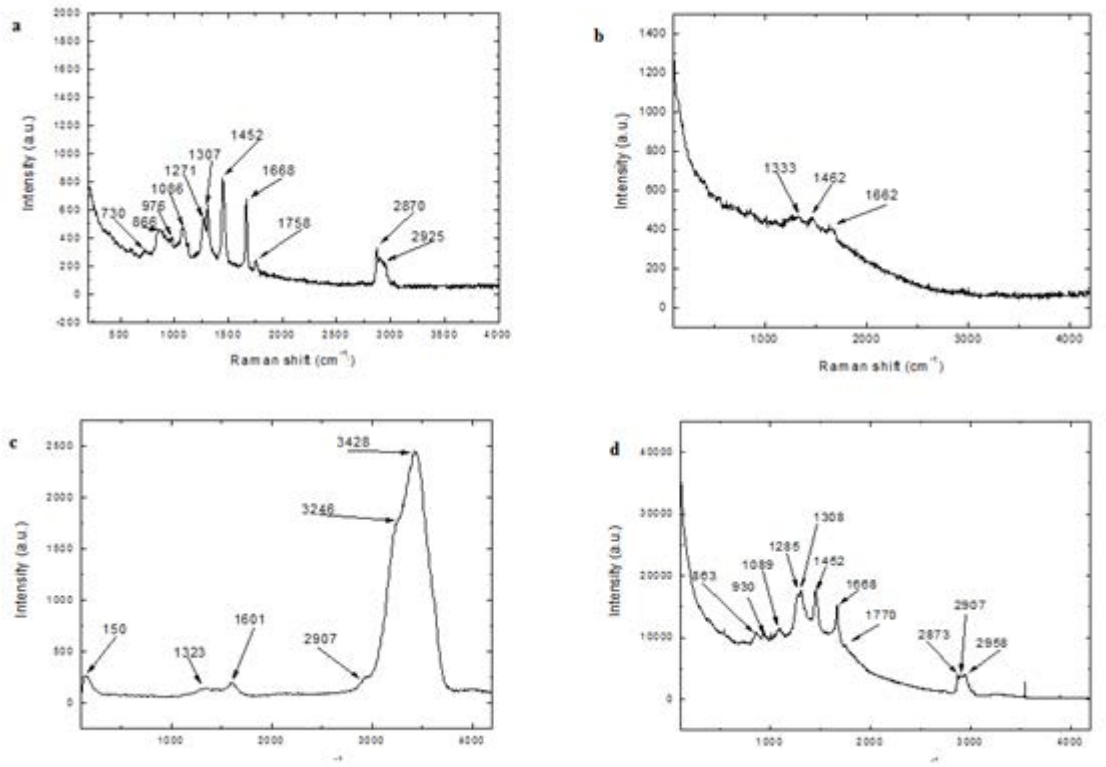
5.7 Medição de Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é um complemento ao FTIR, é baseada na dispersão inelástica de fótons de um laser, pois as bandas que são fortes pela técnica de Raman geralmente são fracas no FTIR e vice-versa. A maior limitação da técnica de Raman deve-

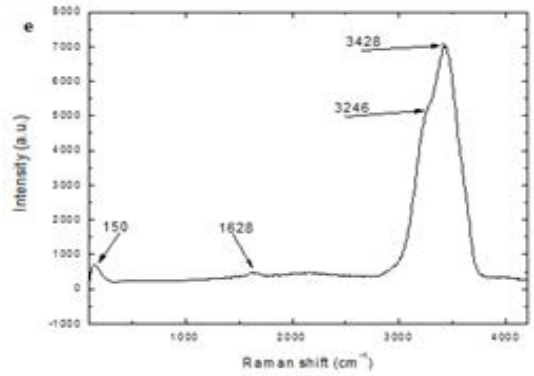
se a dispersão espontânea dos fótons, sendo extremamente fraca e requerendo um longo tempo de aquisição para medição (Caine et al., 2012).

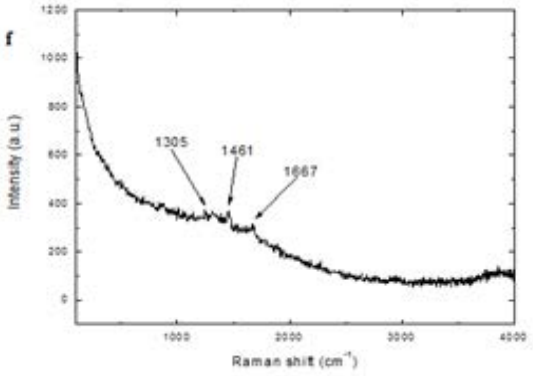
Assim como no FTIR foram consideradas as bexigas com lesões mais representativas dos grupos de animais e as dispersões de tratamento a que foram sumetidos levaram aos seguintes espectros (Figura 32). A partir dos espectros podemos obter a tabela com os picos observados (Tabela 6).

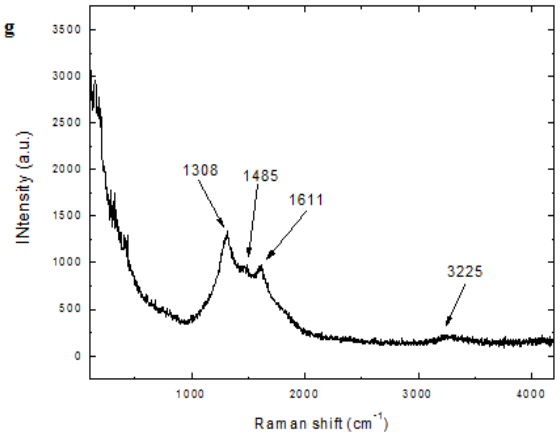
Figura 32: Espectro típico de raman das bexigas dos grupos de estudo em análise, e as formulações a que cada grupo de tratamento foi submetido com seus picos determinados. Controle (a), Câncer (b), formulação de rGo (c), grupo tratado com rGO (D), formulação de rGo+CIS (e), grupo tratado com rGO+CIS (f), formulação de rGo+DOXO (g), grupo tratado com rGO+DOXO (h), formulação de rGo+CIS+DOXO (i), grupo tratado com rGO+CIS+DOXO (j).

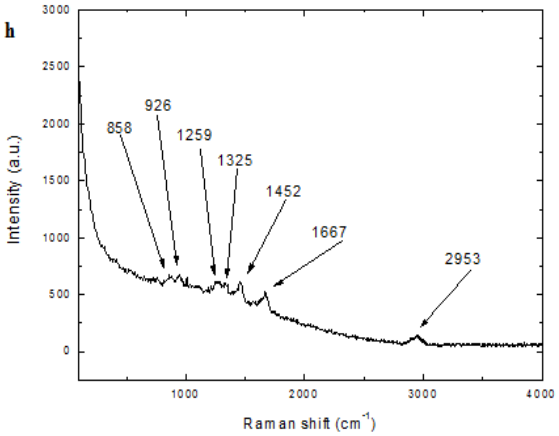


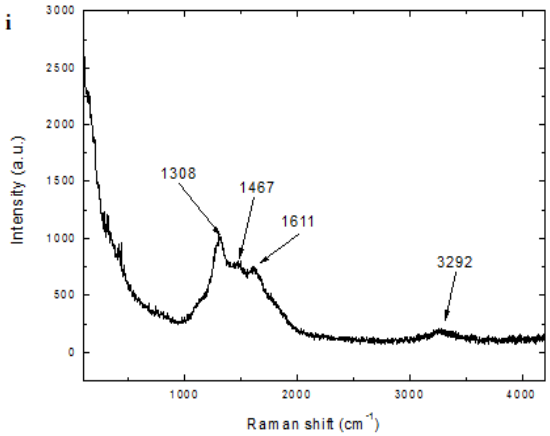
...Cont.


e
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
3428
3246
1628
150


f
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
1305
1461
1667


g
INtensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
1308
1485
1611
3225


h
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
858
926
1259
1325
1452
1667
2953


i
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
1308
1467
1611
3292

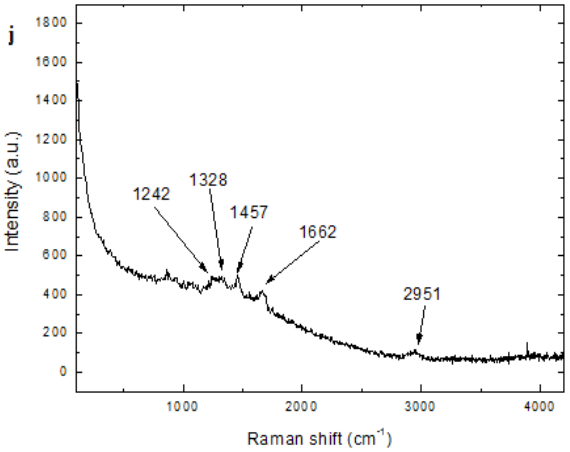

j
Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
1242
1328
1457
1662
2951

Tabela 6: Análise do espectro de Raman das bexigas urinárias Controle (Grupo 1), Câncer (Grupo 2), Câncer+rGO (Grupo 3), Câncer+rGO+CIS (Grupo 4), Câncer+rGO+DOXO (Grupo 5) e Câncer+rGO+CIS+DOXO (Grupo 6).

Comprimento de onda (cm^{-1})						Atribuições do pico	Ref
Grupo 1	**Grupo 2**	**Grupo 3**	**Grupo 4**	**Grupo 5**	**Grupo 6**		
730						Fosfotidilserina (lipídeo)	2
				858		Tirosina, colágeno	1
866	863					Vibração de ribose, um dos modos distintos de RNA (com 915 e 974 cm^{-1})	1
		930				Picos de carboidratos para soluções e sólidos	1
976						Vibração de ribose, um dos modos distintos de RNA (com 874 e 915 cm^{-1})	1
1086		1089				Vibração de gauche (C-C)	1
					1242	Amida III (folha β e distribuição aleatória)	1
				1259		Citosina (NH_2), guanina Amido III	1
1271						Movimento de CHα’	1
		1285				Citosina	1
1307		1308	1305			CH_3/CH_2 twisting ou modo de ligação de lipídeos / colágeno	1
				1325		Modo wagging CH_3CH_2 em bases purina de ácidos nucleícos	1
					1328	Fosfolipídeos típicos	1
	1333					Guanina	1
1452		1452		1452		Banda de proteínas Metoxil em forma de guarda chuva Forma de ligação de C-H de proteínas estruturais	1
					1457	Desoxirribose	1

Cont...

Comprimento de onda (cm^{-1})				Atribuições do pico	Ref
1462	1461			Dissacarídeos, sucrose, deformação de proteínas simétricas de CH_2 e CH_3	3
1662			1662	Triptofano	1
				Triptofano &/ ou folha-β	
				Triptofano (IgG)	
				Banda de proteína	1
				Alongamento da banda C=C	
				Estrutura α hélice da amida I	
	1667	1667		Modo estrutural de proteínas tumorais	
				Alongamento do carbonil (C=O)	1
1668	1668			Ester de colesterol	
				Uma das posições de absorção para o alongamento de vibrações de C=O do cortisol	1
1758					
				Vibrações de alongamento da ligação C=O da δ lactona	4
	1770				
2870	2873			*	
	2907			Composto	1
2925				Alongamento simétrico de CH_3	1
			2951	Alongamento assimétrico de CH_3	1
		2953		Alongamento assimétrico de CH_3	1

*não foi encontrado na literatura atribuição ao pico.
[1] Movasaghi et al., 2007
[2] Harvey et al., 2013
[3] Hu et al., 2013
[4] Parker, F.S., 1983

Segundo Kallaway et al. (2013) a espectroscopia de Raman é considerada um potencial método para os histopatologistas na identificação e classificação de mudanças bioquímicas relacionadas a carcinogênese, demostrando ser rápida, reprodutível e não destrutiva da composição específica de tecidos.

Estudos realizados por Chen et al. (2014) relatam que quando células normais iniciam um processo patogênico a estrutura conformacional e as macromoléculas que constituem a célula levam a uma mudança no tecido, assim a análise da espectroscopia de Raman pode revelar alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais em células bem como em tecidos, podendo ainda caracterizar uma bioquímica maligna quando associada a outras moléculas. A utilização desta técnica na análise de biomoléculas tem a vantagem de requerer uma pequena quantidade de amostra, ser rápida e resistente a interferência de água, não causando danos ao tecido. Assim, é amplamente usada na área médica através de: determinação de estruturas secundárias de proteínas; interações do DNA e fármacos quimioterápicos; diagnóstico de células danificadas assim como tecidos e análise de fluídos corporais.

Os mesmos autores relatam ainda, que no tecido normal da bexiga urinária encontramos bandas em 875, 1080, 1289, 1303, 1446 e 1657 cm^{-1}, as quais estão aumentadas e podem ser associadas a lipídeos e proteínas. Draga et al. (2010) assinala que as bandas observadas no câncer de bexiga 1330, 1462 e 1662 cm^{-1} referem-se a guanina, proteínas e triptofano respectivamente. Os picos do tecido normal geralmente aparecem deslocados ou ausentes nos tecidos tumorais, sendo deslocados entre 1 a 5 cm^{-1}. É reconhecido que a detecção de aminoácidos não aromáticos é um desafio porque eles produzem fracos sinais vibracionais devido sua fraca polaridade. No entanto, aminoácidos aromáticos exibem picos significativos vibracionais devido a presença do anel de benzeno. Os picos identificados de ácido nucléico são decorrentes da vibração de bases de DNA, que são mascaradas em tecido normal. Durante a transformação maligna as células proliferam de maneira incontrolada e a quantidade de DNA aumenta significativamente, o que é acompanhado por mudanças de fosfato, desoxirribose ou bases (Chen et al., 2014).

De acordo com Hu et al. (2013) a presença de ácidos nucleicos na banda em 1340 cm^{-1} deve-se a malignidade da lesão neoplásica, tratando-se de um processo celular com elevados níveis proteicos e lipídicos, o que condiz com os espectros analisados, onde foi visualizado a banda no Grupo Câncer, caracterizado pela administração do MNU induzir uma hipermetilação no DNA

Para observar a interação dos nanocompostos no tratamento do CBNMI foram considerados somente os picos diferentes dos apresentados no grupo controle e Câncer. Deste modo podemos identificar no grupo de tratamento rGO os seguintes picos: 930, 1285, 1770, 2958 cm^{-1}.

Picos de carboidratos em 930 cm^{-1} de acordo com estudos realizados por Kamemoto et al. (2010) revelam que esse acúmulo do composto ocorre durante a maturação, desaparecendo com a perda de diferenciação durante a neoplasia. O pico 1285 citosina de acordo com estudos de Buckmaster et al. (2009) são associados com ácidos nucleicos e a estrutura de DNA, sugerindo um começo da fragmentação do DNA durante apoptose, indicando que somente o nanocarreador rGO induz a apoptose celular.

No grupo de tratamento rGo+CIS foi observado o pico em 1667 cm^{-1}, segundo Movasaghi et al. (2007) refere-se a uma banda de proteína, alongamento da banda C=C, estrutura α hélice da amida I. Isso garante a hipótese que a Cis levou a uma reestruturação do tecido.

No grupo de tratamento rGO+DOXO foram observados os seguintes picos: 858, 1259, 1325, 1667, 2953 cm^{-1}. Stone et al. (2007) citam que o pico em 858 cm^{-1} refere-se a tirosina e o colágeno. A DOXO induz o colágeno 18, o qual é antiangiogênio consecutivamente levando a diminuição da proliferação celular.

O pico 1325 cm^{-1} ocorre devido ao movimento de CH_3CH_2 em bases purina de ácidos nucléicos, segundo estudos de Buckmaster et al. (2009), indicando que esse pico é um marcador para morte celular, o qual sugere ocorrer pela interação entre a DOXO e o DNA. A banda 1667 cm^{-1} caracteriza alongamento da ligação C=C, ou estrutura α hélice da amida I, sugerindo uma reestruturação das proteínas do tecido.

Lyng et al. (2007) afirmam que a banda em 2953 cm^{-1} refere-se ao alongamento assimétrico de CH_3, mostrando que a espectroscopia de Raman é capaz de distinguir o CH_3 de CH, CH_2, os quais possuem as mesmas características no espectro.

Mudanças nas propriedades ópticas do tecido, como o aumento na espessura do urotélio, e mudanças morfológicas (densidade celular aumentada) causam uma atenuada penetração da luz excitada, diminuindo os fótons emitidos pelos tecidos na região do estroma dos tecidos neoplásicos em comparação com o tecido normal (Mo et al., 2009).

No grupo de tratamento rGo+CIS+ DOXO foram observados os seguintes picos: 1242, 1328, 1457, 2951 cm^{-1}. De acordo com Movasaghi et al. (2007) o pico 1242 cm^{-1} representa uma amida III (folha β e distribuição aleatória). Segundo Bushman et al.

(2001) as vibrações de amida III é atribuída a estrutura de proteínas como a elastina e colágeno.

Movasaghi et al. (2007) identifica o pico 1328 cm^{-1} como fosfolipídeos típicos, sugerindo uma reestruturação dos fosfolipídeos do urotélio. Para Movasaghi et al. (2007) a banda 1457 cm^{-1} é característica de desoxirribose, a hipótese de sua expressão é decorrente da interação dos quimioterápicos com o DNA.

Bandas entre 1230 a 1300 cm^{-1} de acordo com Draga et al. (2010), referem-se a lipídeos e proteínas, os quais no tecido normal da bexiga urinária são derivados da submucosa e camada muscular, sendo que para Chen et al. (2014) os picos de lipídios são gerados principalmente devido a vibração da membrana celular, ligações de C-C e C-H de lipídeos e de ácidos graxos insaturados C=C, o que indica a reestruturação nos fosfolipídeos das membranas nas células do urotélio.

Segundo Chen et al. (2014) picos atribuídos a compostos de amino III são principalmente produzidos pela vibração de alongamento de C-N e vibração de ligação N-H, os quais indicam proteína em estrutura de folha-β, a expressão de tais picos é indicativo de uma reestruturação das proteínas do tecido.

As mudanças que ocorrem estão associadas com a progressão da doença, como no caso da bexiga, onde os tumores geralmente são papilares e bastante vasculares que não penetram áreas necróticas (Stone et al., 2007). A identificação de mudanças químicas no espectro de Raman de tecidos saudáveis e tecidos patológicos permite o entendimento dos efeitos dos tratamentos, podendo-se otimizar as informações patológicas (Jong et al., 2006), sendo que a morte celular não ocorre como uma lenta degradação de biomoléculas, mas um evento singular rápido (Buckmaster et al. 2009). A espectroscopia de Raman permite uma primeira aproximação entre as bases bioquímicas promovendo um melhor entendimento do processo patológico e da carcinogênese (Stone et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Ao final das atividades desenvolvidas e mediante aos objetivos traçados na concepção deste estudo, pode-se concluir que:

- Todas a técnicas empregadas na caracterização da amostra de rGO mostraram-se úteis, fornecendo dados que confirmaram a natureza do composto. A utilização de um conjunto de técnicas demonstrou ser de importância e necessária para a obtenção de resultados confiáveis e mais seguros;

- A baixa toxicidade de rGO foi comprovada pela avaliação hepática com valores mais expressivos de TGO nos Grupos Câncer+rGO+CIS e Câncer+rGO+DOXO quando comparados com o Grupo Câncer+rGO+CIS+DOXO, podendo indicar um acúmulo no fígado decorrente de suas metabolizações, comprometendo seu funcionamento; e pela avaliação renal onde os valores de creatinina mostraram acometimento no Grupo Câncer enquanto que nos Grupos que receberam tratamento foi evidenciado valores próximos ao Grupo Controle, na avaliação do parâmetro de uréia o acometimento renal foi observado no Grupo Câncer, nos grupos com CIS e DOXO há uma tendência de recuperação renal devido ao rGO contornar a nefrotoxicidade dos quimioterápicos. Os indicadores bioquímicos indicam que o sistema nanoestruturado levou a uma redução na distribuição dos fármacos, minimizando os efeitos adversos;

- Na análise histopatológica, avaliando o grau de severidade das lesões, o Grupo Câncer comprovou que o modelo de indução foi efetivo, o Grupo+Câncer+rGO e Câncer+rGO+CIS não mostraram ser tratamentos efetivos. O Grupo Câncer+rGO+DOXO foi observado uma diminuição no grau de severidade das lesões. O grupo com associação dos quimioterápicos CIS e DOXO na dispersão de rGO apresentou o melhor resultado devido a diminuição no grau de severidade das lesões do CBNMI induzido quimicamente;

- A imunorreatividade de NOX 1 e Nrf2 intensa e fraca respectivamente, nos Grupos Câncer, Câncer+rGO, Câncer+rGO+CIS, Câncer+rGO+DOXO, representou um grau de severidade das lesões devido ao fenótipo maligno e agressivo característico pela expressão de NOX1, enquanto Nrf2 sinalizou que os grupos dos quimioterápicos não apresentaram resistência ao tratamento e rGO estimulou o reparo via Nrf2 no Grupo Câncer+rGO+CIS+DOXO. A imunorreatividade de PTEN e PI3K foram fracas e intensas respectivamente, nos Grupos Câncer, Câncer+rGO, Câncer+rGO+CIS,

Câncer+rGO+DOXO, no Grupo Câncer+rGO+CIS+DOXO a estimulação de PTEN e diminuição da expressão de PI3K estabelece uma tendência de recuperação do tecido;

- Os ensaios de FTIR e Raman comprovaram as mudanças estruturais e bioquímicas ocorridas na bexiga urinária diante do processo patológico e da exposição aos quimioterápicos, permitindo sua utilização como ferramenta auxiliar na compreensão das alterações diante da exposição ao carcinógeno, nanoestrutura e quimioterápicos.

A análise sistemática da farmacocinética, absorção, distribuição, metabolismo e excreção, podem levar ao melhoramento do *design* do rGO na aplicação terapêutica. O seu perfil toxicológico, eficácia e segurança serão passos essenciais na evolução para desenvolvimento, assim como acelerar a excreção ou mesmo degradação do rGO funcionalizado em sistemas biológicos, tornando desafios relevantes para o futuro, tanto para o desenvolvimento da nanomedicina de MBG, como no fornecimento de orientação de segurança para todos os pesquisadores que trabalham com esse novo tipo de nanomateriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of Trigonella foenum-graecum in mice. **Journal of ethnopharmacology**; v.70, pp. 65-68, 2000.

AFANAS'EV, I. Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging. **Aging and disease**; v.2, pp. 219-30, 2011.

AGUIAR, F.A. Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-13052009-133219/pt-br.php. Acesso em: 17/12/2014.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.;** v. 71, pp. 505-518, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos: Conceitos técnicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#1.2>. Acesso em: 6/10/ 2014.

ARNOLD, R.S.; HE, J.; REMO, A.; RITSICK, D.; YIN-GOEN, Q.; LAMBETH, J.D; DATTA, M.W., YOUNG, A.N., PETROS, J.A. Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1. **American Journal Pathology**; v. 171, pp. 2021-32, 2007.

ASAI, T. Nanoparticle-Mediated Delivery of Anticancer Agents to Tumor Angiogenic Vessels. Department of Medical Biochemistry. **Biol. Pharm. Bull**; v. 35, pp. 1855-61, 2012.

ASKELAND, E.J.; NEWTON, M.R.; O'DONNELL, M.A.; LUO, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. **Adv. Urol**.; v.2012, pp.1879-87, 2012.

AUERBACH, O.; GARFINKEL, L. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweetners. **Cancer**; v. 64, pp.983-7, 1989.

AYARI, C.; BERGERON, A.; LARUE, H.; MÉNARD, C.; FRADET, Y. Toll-like receptors in normal and malignat human baldders. **Journal of Urology**; v.185, pp. 1985-91, 2011.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat. Rev. Cancer**; v.6, pp. 107-16, 2006.

BAYRAKTAR, N.; KILIC, S.; BAYRAKTAR, M.R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. **J. Clin. Lab. Anal**.; v.24, pp.25-30, 2010.

BERGGREN, P.; STEINECK, G.; ADOLFSSON, J.; HANSSON, J.; JANSSON, O.; LARSSON, P.; SANDSTEDT, B.; WIJKSTROM, H.; HEMMINKI, K. p53 mutations in urinary bladder cancer. **Br J Cancer**; v. 84, pp. 1505-11, 2001.

BILLINGHAM, R.E.; SILVERS, W.K. Inbred animals and tissue transplantation immunity, with an index of some inbred strains other than mice. **Transplant Bull**; v.6, pp.399-406, 1959

BINATTI, A.M. Uso de espectroscopias e difração de raios X aplicadas à caracterização mineralógica de solos. Tese de doutorado (Instituto de Física de São Carlos) Universidade de São Paulo, São Carlos – SP. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-17012008-154518/pt-br.php. Acesso em: 18/12/2014.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free radical biology & medicine**; v.76C, pp. 208-226, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-americana de saúde. Nanotecnologia: A interação célula e nanopartículas. Brasília, pp. 89-102, 2011.

BRENNAN ,P.; BOGILLOT, O.; CORDIER, S.; GREISER, E.; SCHILL, W.; VINEIS, P.; LOPEZ-ABENTE, G.; TZONOU, A.; CHANG-CLAUDE, J.; BOLM-AUDORFF, U.; JOCKEL, K.H.; DONATO, F.; SERRA, C.; WAHRENDORF, J.; HOURS, M.; MANNETJE, A.; KOGEVINAS, M.; BOFFETTA, P.; Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11case-control studies. **Int. J. Cancer***;* v. 86, pp.289-94, 2000.

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.

BUCKMASTER, R.; ASPHAHANI, F.; THEIN, M.; XU, J.; ZHANG, M. Detection of drug-induced cellular changes using confocal Raman spectroscopy on patterned single-cell biosensors. **Analyst***;* v.134, pp. 1440-6, 2009.

BUSHMAN, H.P.; DEINUM, G.; MOTZ, J.Y.; FITZMAURICE, M.; KRAMER, J.R.; LAARSE, A.V.; BRUSCHKE, A.V.; MICHAEL, S.F. Raman microscpectroscopy of human coronary atherosclerosis: Biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic strutures in situ. **Cardiovascular Pathology***;* v. 10, pp. 69-83, 2001.

CADWELL, K.; PHILIPS, J. Autophagy Meets Phagocytosis. **Immunity**; v. 39, pp. 425-27, 2013.

CAINE, S.; HERAUD, P.; TOBIN, M.J.; MCNAUGHTON, D.; BERNARD, C.C. The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue. **Neuroimage**; v. 59; pp. 3624-40, 2012.

CARBON. Chemicool Tabela Periódica. Chemicool.com. 25 de julho, 2014. Disponível em : www.chemicool.com/elements/carbon.html. Acesso em: 17/12/2014.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci**.; v.46, pp. 1-17, 2010.

CASTILLO, J.J.; SYVENDSEN, W.E.; ROZLOSNIK, N.; ESCOBAR, P.; MARTINEZ, F.; CASTILLO-LEON, J. Detection of cancer cells using a peptide nanotube-folic acid modified graphene electrode. **Analyst***;* v.138, pp. 1026-1031, 2013.

CASTILLO-MARTIN, M.; DOMINGO-DOMENECH, J.; KARNI-SCHMIDT, O.; MATOS, T.; CORDON-CARDO, C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. **Urol Oncol**.; v. 28, pp. 401–408, 2010.

CERIZE, N. N. P. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica. Tese de Doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-03072012-140751/pt-br.php. Acesso em: 30/11/2014.

CERNIGLIA, G.J.; KARAR, J.; TYAGI, S.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; RENGAN, R.; KOUMENIS, C.; MAITY A. Inhibition of autophagy as a strategy to augument radiosensitization by dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235. **Mol Pharmacol***.;* v. 82, pp.1230-40, 2012.

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.

CHATTERJEE, N.; EOM, H.J.; CHOI, J. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions. **Biomaterials**; v. 35, pp. 1109-27, 2014.

CHEN, M.L.; HE Y.J.; CHEN, X.W.; WANG, J.H. Quantum-dot-conjugated graphene as a probe for simultaneous cancer-targeted fluorescent imaging, tracking, and monitoring drug delivery. **Bioconjug Chem.**; v. 24, pp. 387-397, 2013.

CHEN, Y.; DAI, J.; ZHOU, X.; LIU, Y.; ZHANG, W.; PENG, G. Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. **PLoS One**; v.9, 2014.

CHENG, L.C.; JIANG, X.; WANG, J.; CHEN, C.; LIU, R.S. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells. **Nanoscale***;* v.5, pp.3547-69, 2013.

CHIONG, E.; GASTON, K.E.; GROSSMAN, H.B. Urinary markers in screening patients with hematuria. **World J Urol***,;* v. 26, pp. 35-30, 2008.

CHONG, Y.; MA, Y.; SHEN, H.; TU, X.; ZHOU, X.; XU, J.; DAI, J.; FAN, S.; ZHANG, Z. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. **Biomaterials***;* v. 35, pp. 5041-8, 2014.

CLAERHOUT, S.; VERSCHOOTEN, L.; VAN KELST, S.; DE VOS, R.; PROBY, C.; AGOSTINIS, P.; GARMYN, M. Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. *Int J* **Cancer***;* v. 127, pp. 2790-803, 2010.

COHEN, S.M. Comparative Pathology of Proliferative Lesions of the Urinary Bladder. **Toxicol. Pathol***.;* v.30, pp. 663-71, 2002.

COHEN, S.M.; ELLWEIN, S.L. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. **Cancer Res**.; v. 51, pp.6493-6505, 1991.

COHEN, S.M.; JOHANSSON, S.L. Epidemiology and etiology of bladder cancer. **Urol Clin North Am.**; v.19, pp.421-8, 1992.

COLOMBO, J. E RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço Genetic Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**; v.55, pp. 165-174, 2008.

CRALLAN, R.A.; GEORGOPOULOS, N.T.; SOTHGATE, J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. **Carcinogenesi***s*; v.27, pp.374–381, 2006.

CUI, L.; ZHU, J.; MENG, X.; YIN, H.; PAN, X.; AI, S. Controlled chitosan coated Prussian blue nanoparticles with the mixture of graphene nanosheets and carbon nanoshperes as a redox mediator for the electrochemical oxidation of nitrite. **Sensors and Actuators B: Chemical**; v.161; pp. 641-647, 2012.

DAKWAR, G.R.; ZAGATO, E.; DELANGHE, J.; HOBEL, S.; AIGNER, A.; DENYS, H.; BRAECKMANS, K.; CEELEN, W.; DE SMEDT, S.C.; REMAUT, K. Colloidal stability of nano-sized particles in the peritoneal fluid: towards optimizing drug delivery systems for intraperitoneal therapy. **Acta biomaterial**; v.10, pp. 2965-75, 2014.

DAKWAR, G.R.; ZAGATO, E.; DELANGHE, J.; HOBEL, S.; AIGNER, A.; DENYS, H.; BRAECKMANS, K.; CEELEN, W.; DE SMEDT, S.C.; REMAUT, K. Colloidal stability of nano-sized particles in the peritoneal fluid: towards optimizing drug delivery systems for intraperitoneal therapy. **Acta biomaterial**; v.10, pp. 2965-75, 2014.

DAS, S.; SINGH, S.; SINGH, V.; JOUNG, D.; DOWDING, J.M.; REID, D.; ANDERSON, J.; ZHAI, L.; KHONDAKER, S.I.; SELF, W.T.; SEAL, S. Oxygenated Functional Group Density on Graphene Oxide: Its Effect on Cell Toxicity. **Particle & Particle Systems Characterization**; v. 30, pp. 148-157, 2013.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology***;* v. 740, pp. 364-378, 2014.

DEDRICK, R.L.; FLESSNER, M.F. Pharmacokinetic Problems in Peritoneal Drug drug administration: tissue penetration and surface exposure. **J Natl Cancer Inst.***;* v.89, pp. 480-7, 1997.

DEGRAFF, D.J.; CATES, J.M.; MAUNEY, J.R.; CLARK, P.E.; MATUSIK, R.J.; ADAM, R.M. When urothelial differention pathways GO wrong: Implications for bladder câncer development and progression. **Urologic Oncology**; v. 31, pp. 802-11 2011.

DI CRISTOFANO A. & PANDOLFI P.P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**; v.100; pp. 387-90, 2000.

DRAGA, R.O.; GRIMBERGEN, M.C.; VIJVERBERG, P.L.; VAN SWOL, C.F.; JONGES, T.G.; KUMMER, J.A.; RUUD BOSH, J.L. In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy. **Anal Chem.**; v.14, 2010.

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-RIFAI, W.; KAMEL, D.; LARRAMENDY, M.L.; SHOMAN, S.; GAD, Y.; BAITHUN, S.; EL-AWADY, M.; EISSA, S.; KHALED, H.; SOLONESKI, S.; SHEAFF, M.; KNNUTILA, S. DNA copy number changes in Schistossoma–associated and non-Schistossoma associated bladder cancer. **Am J Pathol**.; v. 156, pp.871-8, 2000

ELSBACH, P.; WEISS, P. A revaluation of the roles of O_2- dependent and O_2- independent microbicidal systems of phagocytes. **Rev Infect Dis**.; v.5, pp.843-853, 1983.

ENG, J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? **Radiology**; v. 227, pp. 309-313, 2003.

EPSTEIN, J.L.; AMIN, M.B.; REUTER, V.R. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (tranticional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. **Am J Surg Pathol**.; v.22, pp.1435-48, 1998.

FAIR, W.R.; FUKS, Z.Y.; SCHER, H.I. Cancer of the bladder. In DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Cancer – Principles and Practice of Oncology. 4ª edition, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1993.

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.14, 2012.

FERNANDES, F.M. Síntese de nanotubos de carbono orientados e aplicação na produção de pontas de AFM. Dissertação de Mestrado (Instituto de Física) Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-18112008-143638/pt-br.php. Acesso em: 18/12/2014.

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.

FISCHER, H. C.; CHAN, W.C.W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current opinion in biotechnology**; v.19, pp. 565-71, 2007.

FLOREA, A.M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers**; v. 3, pp. 1351-71, 2011.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Princípios físico químicos em farmácia. São Paulo, Edusp, pp.732, 2003

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.117-30, 2003.

GLASSFORD, S.E.; BYRNE, B.; KAZARIN, S.G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. **Biochim Biophys Act***,*; v.1834; pp. 2849-58, 2013.

GONTIJO AM, MARCONDES JP, ELIAS FN, DE OLIVEIRA ML, DE LIMA RO, SALVADORI DM, DE CAMARGO JL. DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. **Environ Mol Mutagen.**; v.40, pp.190-9, 2002.

GONZÁLEZ, F. H.; SCHEFFER, J. F. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil***;* v. 1, pp. 73-79, 2003.

GREENE, F.L. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. **Bull Am Coll Surg**.; v. 87, pp.13-5, 2002.

GUHASARKAR, S.; BANERJEE, R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunites and novel strategies. **Journal of Controlled Release**; v.148, pp.147-159, 2010.

GUO, X.; MEI, N. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. **Journal of food and drug analysis***;* v. 22, pp. 105-15, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. "Hallmarks of cancer: the next generation". **Cell**; v.144, pp.646-74, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**; v.7, pp. 57-70, 2000.

HARVEY, T.J.; HUGHES, C.; WARD, A.D.; FARIA, E.C.; HENDERSON, A.; CLARKE, N.W.; BROWN, M.D.; SNOOK, R.D.; GARDNER, P. Classification of fixed urological cells using Raman tweezers. **J Biophotonics**.; v. 2, pp. 47-69, 2009.

HAYAT, M.J.; HOWLADER, N.; REICHMAN, M.E.; EDWARDS, B.K. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance. Epidemiology and End Results (SEER) Program. **Oncologist**; v. 12, pp. 20-37, 2007.

HAYES, W.A. Principles and Methods of Toxicology, v. 3° edição: Raven Press, pp.579-600, 1994.

HE, C.; KIM, S. W.; LEE, D.S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. **J. Control. Rel**.; v. 127, pp. 189–207, 2008.

HEIJDEN, A.G.V. & WITJES, J.A. New Treatments for Non-muscle-invasive Bladder Cancer. **European Urological Review***;* v.4, pp. 39-42, 2009.

HONG, H.; YANG, K.; ZHANG, Y.; ENGLE, J.W.; FENG, L.; YANG, Y.; et al. In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene. **ACS Nano**.; v.6, pp. 2361-2370, 2012.

HU, C.; WANG, J.; ZHENG, C.; XU, S.; ZHANG, H.; LIANG, Y.; BI, L.; FAN, Z.; HAN, B.; XU, W. Raman spectra exploring breast tissues: comparison of principal component analysis and support vector machine-recursive feature elimination. **Med Phys.***;* v. 40, 2013.

HUANG, C.; NEOH, K.G.; XU, L.; KANG, E.T.; CHIONG, E. Polymeric nanoparticles with encapsulated superparamagnetic iron oxide and conjugated cisplatin for potential bladder cancer therapy. **Biomacromolecules**; v.13; pp. 2513-20, 2012.

HUANG, K.J.; LI, J.; WU, Y.Y.; LIU, Y.M. Amperometric immunobiosensor for α-fetoprotein using Au nanoparticles/chitosan/TiO_2–graphene composite based platform. **Bioelectrochemistry***;* v. 90, pp. 18-23, 2013.

ICHIMURA, Y.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. **J Urol**.; v.172, p.728-32, 2004.

IIDA, K.; ITOH, K.; KUMAGAI, Y. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. **Cancer Res**.; v.64, pp.6424–31, 2004.

ILLUM, L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. **J. Control. Rel**.; v. 87, p. 187-198, 2003.

INCA. Instituto Nacional Contra o Câncer. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga. Acesso em: 20/11/2014.

JABIR, N. R.; TABREZ, S.; ASHRAF, G. M.; SHAKIL, S.; DAMANHOURI, G.A.; KAMAL, M.A. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**; v.7, pp. 4391-4408, 2012.

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.

JONG, B.W.; SCHUT, T.C.; MAQUELIN, K.; VAN DER KWAST, T.; BANGMA, C.H.; KOOK, D.J.; PUPPELS, G.J. Discrimination between nontumor bladder tissue and tumor by Raman spectroscopy. **Anal Chem***;* v.75, pp.7761-9, 2006.

KABE, Y.; ANDO, K.; HIRAO, S.; YOSHIDA, M.; HANDA, H. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxid Redox Signal**; v.7, pp. 395-403, 2005.

KALLAWAY, C.; ALMOND, L.M.; BARR, H.; WOOD, J.; HUTCHINGS, J.; KENDALL, C.; STONE, N. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. **Photodiagnosis Photodyn Ther**.; v.10, pp. 207-19, 2013.

KAMEMOTO, L.E.;, MISRA, A.K.; SHARMA, S.K.; GOODMAN, M.T.; LUK, H.; DYKES, A.C.; ACOSTA, T. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. **Appl Spectrosc**.; v.64, pp. 255-61, 2010.

KANAYAMA, I.; MIYAJI, H.; TAKITA, H.; NISHIDA, E.; TSUJI, M.; FUGETSU, B.; SUN, L.; INOUE, K.; IBARA, A.; AKASAKA, T.; SUGAYA, T.; KAWANAMI, M. Comparative study of bioactivity of collagen scaffolds coated with graphene oxide and reduced graphene oxide. **Int J Nanomedicine**; v.11; pp.3363-73, 2014.

KANZ, L.; BRUGGER, W.; SCHEDING, S. Ex vivo manipulation of hematopoietic stem and progenitor cells. **Stem Cells**; v. 16, pp. 199-204, 1998.

KHANDRIKA, L.; KUMAR, B.; KOUL, S.; MARONI, P.; KOUL, H.K. Oxidative stress in prostate cancer. **Cancer Lett**.; v.282, pp.125-136, 2009.

KIM, Y.R.; OH, J.E.; KIM, M.S.; KANG, M.R.; PARK, S.W.; HAN, J.Y.; EOM, H.S.; YOO, N.J. LEE, S.H. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. **J Pathol**.; v. 220, pp. 446-51, 2010.

KIRKALI, Z.; CHAN, T.; MANOHARAN, M.; ALGABA, F.; BUSH, C.; CHENG, L.; KIEMENEY, L.; KRIEGMAIR, M.; MONTINRONI, 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.

KNOWLES, M.A. Tumor suppressor loci in bladder cancer. **Front Biosci**.; v.12, pp. 2233-51, 2007.

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.

KONIOS, D.; STYLIANAKIS, M. M.; STRATAKIS, E.; KYMAKIS, E. Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**; v.430, pp. 108-112, 2014.

KORKOLOPOULOU, P.; LEVIDOU, G.; TRIGKA, E. A.; PREKETE, N.; KARLOU, M.; THYMARA, I.; SAKELLARIOU, S.; FRAGKOU, P.; ISAIADIS, D.; PAVLOPOULOS, P.; PATSOURIS, E.; SAETTA, A.A. A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral onco- gene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. **BJU Int**.; v. 110, pp. 1237-48, 2012.

LI, J. Synthesis of Superior Dispersible Reduced Graphene Oxide. Dissertação de mestrado (Materials Science and Engineering) Shanghai Jiaotong University. Disponível em: http://www.dissertationtopic.net/doc/1681733. Acesso em: 15/01/2015.

LI, J.; CHANG, X.; CHEN, X.; GU, Z.; ZHAO, F.; CHAI, Z.; ZHAO, Y. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. **Biotechnology advances**; v.32, pp. 727-43, 2014.

LIU, J.; CUI, L.; LOSIC, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. **Acta Biomater.;** v.9; pp. 9243-57, 2013.

LIU, Z.; ROBINSON, J.T.; SUN, X.; DAI, H. PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. **Journal of the American Chemical Society**; v.130, pp.10876-77, 2008.

LU, D.; QIAN, J.; YIN, X.; XIAO, Q.; WANG, C.; ZENG, Y. Expression of PTEN and survivin in cervical cancer: promising biological markers for early diagnosis and prognostic evaluation. **Br J Biomed Sci**.; v.69, pp. 143-6, 2012.

LUCZAK, M.W.; JAGODZINSKI, P.P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochem Cytobiol**.; v. 44, pp.143-54, 2006.

LYNG, F.M.; FAOLÁIN, E.O.; CONROY, J.; MEADE, A.D.; KNIEF, P.; DUFFY, B.; HUNTER, M.B.; BYRNE, J.M.; KELEHAN, P.; BYRNE, H.J. Vibrational spectroscopy for cervical cancer pathology, from biochemical analysis to diagnostic tool. **Exp Mol Pathol**.; v.82; pp. 121-9, 2007.

MA, N.; CHALMERS, J.J.; AUNIŅS, J.G.; ZHOU W.; XIE L. Quantitative studies of cell-bubble interactions and cell damage at different Pluronic F-68 and cell concentrations. **Biotechnology Progr***.;* v.20, pp. 1183-91, 2004.

MAGHZAL, G. J.; KRAUSE, K.H.; STOCKER, R.; JAQUET, V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. **Free radical biology & medicin***;* v. 53, pp. 1903-18, 2012.

MALMSTEN, M. Surfactants and polymers in drug delivery. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. New York: Marcel Dekker, 2002, 348p.

MAMANI, J.B. Estudos e Propriedades de Nanopartículas Preparadas via Sol-Gel. Tese de doutorado (Instituto de Física) Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. Disponível em: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-24082009-090624/pt-br.php. Acesso em: 18/12/2014.

MAXWELL. 4.5 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio X. In: Técnicas de caracterização. PUC-RIO Disponível em: http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/18540/18540_5.PDF. Acesso em: 17/12/2014.

Medline Plus. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682221.html. Acesso em: 15/09/2014.

MEHROTRA, R.; TYAGI, G.; JANGIR, D.K.; DAWAR, R.; GUPTA, N. Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **J Ovarian Res**.; v.21, pp. 23-27, 2010.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P.; PÉREZ, A.; ALBA, L. Reactive Oxygen Species-activated p38/ERK 1/2 MAPK Signaling Pathway in the Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guérin (BCG)-induced CCL2 Secretion in Human Monocytic Cell Line THP-1. **Archives of Medical Research**; v.41, pp. 579-85, pp. 2010

MHAWECH- FAUCEGLIA P., CHENEY, R.T., SCHAWALLER, J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review. **Cancer**; v.65, pp. 3624-32, 2006.

MICHAELS, J. D.; MALLIK, A.; PAPOUTSAKIS, E.T. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? **Biotechonology Bioeng**.; v.51, pp. 399-409, 1996.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S.K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discov Today**; v.15, pp. 842-50, 2010.

MITSUI, Y.; YASUMOTO, H.; ARICHI, N.; HONDA, S.; SHIINA, H.; IGAWA, M. Current chemotherapeutic strategies against bladder cancer. **International urology and nephrology**; v. 44, pp. 431-41, 2012.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**; v. 76, pp. 1439-53, 2005.

MO, J.; ZHENG, W.; LOW, J.J.; NG J.; ILACHERAN, A.; HUANG, Z. High wavenumber Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia. **Anal Chem***.;* v. 81, pp.8908-15, 2009.

MOHAMED, F.; SUGARBAKER, P.H. Carrier solutions for intraperitoneal chemotherapy. **Surgical Oncology Clinics of North America**; v.12, pp. 813-824, 2003.

MONOPOLI, M. P.; ABERG, C.; SALVATI, A.; DAWSON, K. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature nanotechnology***;* v.7, pp. 779-86, 2012.

MOON, D. G.;LEE, S. E.; OH, M. M.; LEE, S. C.; JEONG, S. J.; HONG, S. K.; YOON, C. Y.; BYUN, S. S.; PARK, H. S.; CHEON, J. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. **International journal of oncology**; v. 45, pp. 1027-35, 2014.

MOON, D.G.; LEE, SANG E.; OH, M.M.; LEE, S. C.; JEONG, S.J.; HONG, S.K.; YOON, C.Y.; BYUN, S.S.; PARK, H.S.; CHEON, J. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. **International journal of oncolog***;*, v.45, pp. 1027-35, 2014.

MOTTA, V.T. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, pp. 419, 2003.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews***;* v.43, pp.134-79, 2008.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues**. Applied Spectroscopy Reviews***;* v.42, pp.493-541, 2007.

MUSSI, S. V.; SILVA, R. C.; OLIVEIRA, M. C. Lucci, C.M.; Azevedo, R.B.; Ferreira, L.A. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Eur. J. Pharm***. Sci*.; v.48, pp. 282-90, 2012.

NAMANI, A.; LI, Y.; WANG, X.J.; TANG, X. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. **Biochim Biophys Acta**; v. 9, pp. 1875-85, 2014.

NERI, L.M.; BORGATTI, P.; CAPITANI, S.; MARTELLI, A.M. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. **Biochim Biophys Acta**; v.1584, pp. 73-80, 2002.

NEWLING, D.W.W.; DENIS, L.; GERARD, J.P.; SCALLIET, P.G.M.; STOTER, G. BLADDER CANCER. In Peckham M, Pinedo HM, Veronesi (Eds): Oxford Textebook of Oncology. Oxford: Oxford University Press, 1995, pp 1459-1479.

NEZAKATI, T.; COUSINS, B. G.; SEIFALIAN, A. M. Toxicology of chemically modified graphene-based materials for medical application. **Arch Toxicol***.;* v. 88, pp. 1987-2012, 2014.

NIETO-SAMPEDRO, M.; VALLE-ARGOS, B.; GÓMEZ-NICOLA, D.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; NIETO-DÍAZ, M. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. **Clin Med Insights Oncol**.; v. 5, pp. 265-314, 2011.

O'DONNELL, M.A.; BOEHLE, A. Treatment options for BCG failures. **World J Urol**.; v. 24, pp. 481-7, 2006.

OCKNER, R. Doenças do fígado, da vesícula biliar e dos ductos biliares. In: palmitoyl – 2- oleoyl-phosphatidylethanolamine. **Bioch. Bioph. Act***.;* v.1564, p.66-72, 2002.

OCKNER, R. Doenças do fígado, da vesícula biliar e dos ductos biliares. In: WYNGAARDEN, J.B. Tratado de Medicina Interna. 19°ed., v.1. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, pp. 1214, 1993.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; JANSSENS, S.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. **J. Mol. Cell Cardiol**.; v. 52, pp. 1213-1225, 2012.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci***.;* v. 100, pp. 2235-41, 2009.

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.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**; v. 27, pp. 131-38, 2004

OLIVEIRA, P.A.; COLACO, A.; DE LA CRUZ, P.L.F. Experimental Bladder Carcinogenesis- Rodent Models. **Exp Oncol***.;* v.28, pp. 2-11, 2006.

PAONESSA, J.D. ; MUNDAY, C.M.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; MUNDAY, R.; ZHANG, Y. 5,6-Dihydrocyclopenta[c][1,2]-dithiole-3(4H)-thione is a promising cancer chemopreventive agent in the urinary bladder. **Chem Biol Interact**.; v.180, pp. 119-26, 2009.

PARKER, F. S. "Introduction and brief theory,"*Applications of Infrared and Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry",* Plenum, New York, Chap. 1, pp. 21–30, 1983.

PASHOS, C.L.; BOTTEMAN, M.F.; LASKIN, B.L.; REDAELLI, A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. **Cancer Pract**.; v. 10, pp 311-22, 2002.

PAVON, L. F.; OKAMOTO, O. K. Aplicações de recursos nanobiotecnológicos em câncer. **Einstein**, v.5, pp. 74-77, 2007.

PERABO, F.G.; WILLERT, P.L.; WIRGER, A. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. **Anticancer** *Res*.; v.25, pp.3565-73, 2005.

PETROV, P.; STASSIN, F.; PAGNOULLE, C.; JÉRÔME, R. Noncovalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by pyrene containing polymers, **Chemical Communications***;* v. 23, pp. 2904-05, 2003.

PINO, P.D.; PELAZ, B.; ZHANG, Q.; MAFFRE, P.; NIENHAUS, G.U.; PARAK, W. J. Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future. **Materials Horizons**; v. 1, pp. 301-13, 2014.

PRAKASH, S.; MALHOTRA, M.; SHAO, W.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; ABBASI, S. Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. **Adv Drug Deliv Rev**.; v. 63; pp. 1340-51, 2011.

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 Dev**.; v.23, pp.675-80, 2009.

RAMANATHAN, T.; FISHER, F.T.; RUOFF, R.S.; BRISON, L.C. al. Amino-Functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems. **Chemistry of Materials**; v. 17, pp. 1290-95, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Eliminação Farmacocinética de fármacos. In: Rang & Dale Farmacologia, 6ª Edição. Elsevier, Rio de Janeiro, pp.113-117, 2007.

REDELMAN-SIDI, G.; IYER, G.; SOLIT, D. B.; GLICKMAN, M.S. Oncogenic activation of Pak1-dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. **Cancer Research**, v.73, pp. 1156-67, 2013.

REIS, L. O.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; CAGNON, V.H.A.; FÁVARO, W.J. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. **The Journal of Urology**; v. 187, p. 438-445, 2012.

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.

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.

RESZKA, E.; WIECZOREK, E.; JABLONSKA, E.; JANASIK, B.; FENDLER, W.; WASOWICZ, W. Association between plasma selenium level and NRF2 target genes expression in humans. **J Trace Elem Med Biol**.; v. 14, pp. 250-8, 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B.; Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**; v. 49, pp. 1603-16, 2010.

ROY, R.; SINGH, S.K.; CHAUHAN, L.K.S.; DAS, M.; TRIPATHI, A.; DWIVEDI, P.D. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. **Toxicology letters**; v.227, pp. 29-40, 2014.

SAAD, S.Y.; NAJJAR, T.A.; AMMAR, C.; AL-RIKABI, A.L. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. **Pharmacol**. **Res**.; v.43, pp.211 – 218, 2001.

SANCHEZ, V.C.; JACHAK, A.; HURT, R.H.; KANE, A.B. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. **Chem Res Toxicol***.;* v.25, pp. 15-34, 2012.

SCHAMHART, D.H.; DE BOER, E.C.; DE REIJKE, T.M.; KURTH, K. Urinary cytikines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modefiers: Their pratical use. **Eur. Urol.**; v. 37, pp. 16-23, 2000.

SEGAL, A.W.; SHATWELL, K.P. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. **Ann N Y Acad Sci**.; v.832, pp.215-222, 1997.

SEMENZA, G.L. Targeting Hif-a for Cancer Therapy. **Nat Rev Cancer**; v.3, pp. 721-32, 2003.

SFAKIANOS, J.P.; LIN GELLERT, L.; MASCHINO, A.; GOTTO, G. T.; KIM, P.H. AL-AHMADIE, H.; BOCHNER, B.H. The role of PTEN tumor suppressor pathway staining in carcinoma in situ of the bladder. **Urologic oncology**; v.32, pp. 657-62, 2014.

SHAH, G.; ZIELONKA, J.; CHEN, F.; ZHANG, G.; CAO, Y.; KALYANARAMAN, B.; SEE, W. H_2O_2 Generation by bacillus Calmette-Gurin Induces the Cellular Oxidative Stress Response Required for bacillus Calmette-Gurin e Direct Effects on Urothelial Carcinoma Biology. **Journal of Urology**; v. 192, pp. 1238-48, 2014.

SHANMUGAM, V.; SELVAKUMAR, S.; YEH, C.S. Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics. **Chem. Soc. Rev.;** v.43, pp. 6254-87, 2014.

SHAPIRA, A.; LIVNEY, Y.D.; BROXTERMAN, H.J.; ASSARAF, Y.G. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. **Drug Resist Updat**; v.14, pp.150-63, 2011.

SHELLEY, M. D.; MASON, M. D.; KYNASTON, H. Intravesical therapy for superficial bladder câncer: A systemic review of randomised trials and meta-analyses. **Cancer treatment reviews**; v.36, pp. 195-205; 2009.

SHEN, Z.C.; SHEN, T.; WIENTJES, M.G.; O'DONNELL, M.A.; AU, J.L.S. Intravesical treatments of bladder cancer: review. **Pharm. Res**.; v.25, pp.1500−1510, 2008.

SHETTY, G.; KENDALL, C.; SHEPHERD, N.; STONE, N.; BARR, H. Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus. **Br J Cancer**; v.94. pp.1464-4, 2006.

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. A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. **Cancer Res**.; v.69, pp.3157-3164, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. Identificação Especrométrica de Compostos ORGÂNICOS. 7ª edição, Editora LTC, Rio de Janeiro, 2006, 508p.

SIO, T.T.; KO, J.; GUDENA, V.K.; VERMA, N.; CHAUDHARY, U.B. Chemotherapeutic and targeted biological agents for metastatic bladder cancer: acomprehensive review. **Int J Urol**.; v.21, pp.630-7, 2014.

SLOCUM, S.L.; KENSLER, T.W. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol*.; v.85, pp.273-284, 2011.

SOINI, Y.; HAAPASAARI, K. M.; VAARALA, M. H.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; KÄRJÄ, V. KARIHTALA, P. 8-Hydroxydeguanosine and Nitrotyrosine Are Prognostic Factors in Urinary Bladder Carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**; v.4, pp. 267-75, 2011.

SOUZA, W.F.; ARAÚJO, W.M.; de-FREITAS-JUNIOR, J.C.M.; MORGADO-DÍAZ, J.A. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**; v.66, 2014.

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, pp.356-362,1997.

STEINBERG, G.D; BRENDLER, C.B.; ICHIKAWA, T. Characterization of an N-methyl-N-nitrosurea induced autochthonous rat bladder cancer model. **Cancer Res**.; v.50, pp.6668-6741, 1990.

STEWART, D.J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. **Critical reviews in oncology/hematology**; v.63, pp.12-31, 2007.

STONE, N.; HART PRIETO, M.C.; CROW, P.; UFF, J.; RITCHIE, A.W. The use of Raman spectroscopy to provide an estimation of the gross biochemistry associated with urologicalpathologies. **Anal Bioanal Chem.**; v. 387, pp. 1657-68, 2007.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H.K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **European journal of pharmaceutical sciences**; v.37, pp.508−13, 2009.

SUN, X.; LIU, Z.; WELSHER, K.; ROBINSON, J.T.; GOODWIN, A.; ZARIC S.; DAI, H. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. **Nano Res**.*;* v.1; pp. 203-212, 2008.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**; v.49, pp. 330-352, 2007.

TALASKA, G.; SCHAMER, M.; SKIPPER P.; TANNENBAUM S.; CAPORASO, S.; UNRUH, L.; KADLUBAR, F.F.; BARTSCH, H.; MALAVEILLE, C.; VINEIS, P. Detection of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urotelial cells of cigarette smokers: association with smoking, hemoglobina adducts, and urinary mutagenicity. **Cancer Epidemiol Biomarkers Pre**.; v.1, pp. 61-6, 1991.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Editora Roca, 4ª edição, pp. 582, 2007.

TRIPATHI, D.N.; JENA, G.B. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF-kappaB during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. **J Pineal Res**.; v.48, pp. 324-31, 2010.

TROSKI, J.E.; RUCH. Cell-cell comunication in carcinogenesis. **Front Biosci**.; v. 3, pp.208-36, 1998.

TYAGI, P.; WU, P.C.; CHANCELLOR, M.; YOSHIMURA, N.; HUANG, L. Recent advances in intravesical drug/gene delivery. **Mol. Pharm**.; v. 3, pp. 369-379, 2006.

WAKABAYASHI, N.; SKOKO, J. J.; CHARTOUMPEKIS, D. V.; KIMURA, S.; SLOCUM, S.L.; NODA, K.; PALLIYAGURU, D. L.; FUJIMURO, M.; BOLEY, P.; TANAKA, Y.; SHIGEMURA, N.; BISWAL, S.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W. Notch-Nrf2 axis: regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by notch signaling. **Molecular and cellular biology***;* v.34, pp. 653-63, 2014.

WANG, H. C.; CHOUDHARY, S. Reactive oxygen species-mediated therapeutic control of bladder cancer. **Nat. Rev. Urol**.; v. 8, pp.608–16, 2011.

WANG, X.; QUINN, P.J. Cubic phase is induced by cholesterol in the dispersion of 1- palmitoyl – 2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. **Bioch. Bioph. Act**.; v.1564, p.66-72, 2002.

WEINBERG, R.A. Tumor supressor genes. **Science**; v. 254, pp.1138-46, 1991.

WEINTRAUB, M. D.; LI, Q. Q.; AGARWAL, P.K. Advances in intravesical therapy for the treatment of non-muscle invasive bladder cancer (Review). **Molecular and clinical oncology**; v. 5, pp. 656-60, 2014.

WHO. World Health Organization. Cancer. Fact sheet n. 297. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/. Acesso em: 15 set. 2014.

WIENTJES, M.G.; BADALAMENT, R.A.; L.S.AU, J.; Penetration of intravesical doxorubicin in human bladders. **Cancer Chemother Pharmacol**.; 37, 539-546, 1996.

WILLIAMS, P.D.; LEE, J.K.; THEODORESCU, D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. **Neoplasia**; v. 10, pp. 838-46, 2008.

WU, S.; ZHAO, X.; LI, Y.; DU, Q.; SUN, J.; WANG, Y.; WANG, X.; XIA, Y.; WANG, Z.; XIA. Adsorption Properties of Doxorubicin Hydrochloride onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. **L. Materials**; v. 6, pp. 2026-2042, 2013.

YAN, L.; ZHENG, Y.B.; ZHAO, F.; LI, S.; GAO, X.; XU, B.; WEISS, P.S.; ZHAO, Y. Chemistry and physics of single atomic layer: strategies and challenges for functionalization of graphe ne andgraphene-based materials. **Chem Soc Rev**.; v.41, pp. 97-114, 2012.

YANG, K.; FENG, L.; SHI, X.; LIU, Z. Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications. **Chem Soc Rev**.; v.42; pp. 530-47, 2013.

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.

YE, H.; KARIM, A.A.; LOH, X.J. Current treatment options and drug delivery systems as potential therapeutic agents for ovarian cancer: A review. Materials science & engineering. **Materials for biological applications***;* v.45, pp. 609-19, 2014.

YEUNG, C.; DINH, T.; LEE, J. The Health Economics of Bladder Cancer: An Updated Review of the Published Literature. **Pharmacoeconomics**; v.24, 2014.

YOKOTA J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**; v.21, pp.497-503, 2000.

YOU, A.; NAM, C.W.; WAKABAYASHI, N. Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. **Arch Biochem Biophys**.; v.507, pp.356–364, 2011.

YOUNG, R.H. Non-neoplast disorders of the urinaty bladder. In: **Urologic Surgical Pathology**. Chapter 5, (Bostwick, D.G.; CHANG, L.) 2006.

YU, K.; BO, Z.; LU**,** G.; MAO, S.; CUI, S.; ZHU, Y.; CHEN ,X.; RUOFF, R.S.; CHEN, J**.** Growth of carbon nanowalls at atmospheric pressure for one-step gas sensor fabrication. **Nanoscale Res. Lett**.*;* v. 6, pp. 202-224, 2011.

YUEN, F. L. Y.; ZAK, G.; WALDMAN, S. D.; DOCOSLIS, A. Morphology of fibroblasts grown on substrates formed by dielectrophoretically aligned carbon nanotubes. **Cytotechnology**; v. 56, pp. 9-17, 2008.

ZANIN, H.G.; SAITO, E.; CERAGLIOLI, H.J.; BARANAUSKAS, V.; CORAT, E.J. Reduced graphene oxide and vertically aligned carbon nanotubes superhydrophilic films for supercapacitors devices. **Materials Research Bulletin**; v.49, pp. 487-93, 2014.

ZHANG, L.; XIA, J.; ZHAO, Q.; LIU, L.; ZHANG, Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. **Small**; v.22, pp.537-44, 2010.

ZHANG, X.; YIN, J.; PENG, C.; HU, W.; ZHU, Z.; LI, W.; FAN, C.; HUANG, Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. **Carbon**; v.49; pp. 986-95, 2011.

ZHANG, Y.; ZHU, C.; CURADO, M.P.; ZHENG, T.; BOYLE, P. Changing patterns of bladder cancer in the USA: evidence of heterogeneous disease. **BJU Int**.; v.109; pp.52-56, 2011.

ZHANG, Y.; NAYAK, T.R.; HONG, H.; CAI, W. Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications. **Nanoscale**; v.4; pp. 3833-42, 2012.

ZHOU, H., ZHANG, B., ZHENG, J., YU, M., ZHOU, T., ZHAO, K., JIZ, Y., GAO, X., CHEN, C.,WEI, T. The inhibition of migration and invasion of câncer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. **Biomaterials**., v.30, pp 1-11, 2013.

ANEXO

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto "**Efeitos das formulações nanoestruturdas de doxorrubicina e cisplatina em folhas de óxido de grafeno reduzido no tratamento da progressão do câncer de bexiga não-musculo invasivo em ratas**" (protocolo nº **3569-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Wagner José Fávaro / Renata Abreu Villela**, 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 **02 de outubro de 2014**.

Campinas, 02 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/