

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 01/11/2018.



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



ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO IMUNOMODULADOR P-MAPA ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS VERSUS IMUNOTERAPIA COM BCG NA PROGRESSÃO DO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO MÚSCULO INVASIVO

ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA GEHLEN

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

Prof Dr. Wagner José Fávaro

**BOTUCATU - SP
2016**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO
IMUNOMODULADOR P-MAPA ENCAPSULADO EM
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS MUCOADESIVAS
VERSUS IMUNOTERAPIA COM BCG NA PROGRESSÃO DO
CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA NÃO MÚSCULO
INVASIVO

ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

CO-ORIENTADOR: NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO

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

Prof Dr. Wagner José Fávaro

**BOTUCATU - SP
2016**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

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

Lima, Ana Claudia da Silva.

Estudo comparativo dos efeitos do imunomodulador P-MAPA encapsulado em nanopartículas poliméricas mucoadesivas versus imunoterapia com BCG na progressão do câncer de bexiga urinária não músculo invasivo / Ana Claudia da Silva Lima.
- Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Wagner José Fávaro
Coorientador: Nelson Eduardo Durán Cabalero
Capes: 20600003

1. Bexiga - Câncer. 2. Urologia. 3. Fatores imunológicos.
4. Nanotecnologia. 5. Imunoterapia.

Palavras-chave: Câncer de bexiga; Imunoterapia;
Nanotecnologia; P-MAPA; Urologia.

Botucatu, 1 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

(Orientador - UNICAMP/Campinas – SP)

Prof. Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho

(USP/São Paulo – SP)

Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

(UNICAMP/Campinas – SP)

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

(UNICAMP/Campinas – SP)

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

(UNESP/Botucatu - SP)

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

(UNESP/Botucatu - SP)

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

(USP/São Carlos – SP)

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

(USP/São Paulo – SP)

Dedico este trabalho:

à Deus

Minha torre forte, meu auxílio e socorro bem
presente na hora da angústia!

À minha família

Guerreiros incansáveis!

Ao meu amado esposo Paulo Gehlen

Meu exemplo de amor e dedicação, meu
incentivador, meu lugar seguro!

Agradecimentos

Ao professor Wagner por aceitar me orientar e me deixar fazer parte de sua equipe de pesquisa. A ele minha admiração pelo grande profissional que é, mas acima de tudo a minha admiração pela sua humildade e disposição em ajudar ao próximo. Obrigada por me atender sempre que solicitei obrigada por me dar a oportunidade de vivenciar esse tempo em Campinas, pois foi um tempo de muita aprendizagem em todos os sentidos.

Ao professor Durán pela honra de ter sua co-orientação. Sua humildade e conhecimento me fascinaram.

A FARMABRASILIS, especialmente ao Izeu Nunes, por disponibilizar o P-MAPA para minha pesquisa e pela frase que jamais sairá da minha mente: Tem coisas em nossas vidas que realmente são obras “DO DEDO” de Deus!

Ao pessoal do laboratório LCURGIM por todo auxílio nesses anos de pesquisa em especial à Mirian, Joel, Patrick, Queila, Bia, Alexandre Forato, Amanda e Maíza.

A todas as mulheres que cuidavam da limpeza do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Sempre tão alegres e gentis, em especial agradeço a Dona Fátima por sua amizade, por todos os cafés, pães, bolos e muitas coisas deliciosas que faziam os meus dias mais leves.

A todos os técnicos do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Walter, Marquinhos, Nori, Paulão, Pereira por toda ajuda e parceria.

Ao pessoal do Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química da UNICAMP, em especial a Banny, Fabiano, Paula, Jeaniffer, Alzira e ao técnico Chico que nos atendia tão bem mesmo eu sendo da biologia!

As técnicas do Instituto de Química da UNICAMP Claudia, Renata, Daniel pelas inúmeras análises, obrigada por me ensinar e obrigada pela paciência comigo.

Ao pessoal do departamento de Histologia da UNICAMP na pessoa da técnica Raquel que sempre nos recebeu com um sorriso no rosto.

Ao laboratório do professor Osvaldo principalmente ao Marcelo, ao Ricardo (cubano), e ao Paulo (técnico) por sempre me receberem tão amigavelmente.

A Alexandra da Secretaria do IB da UNICAMP por me sempre me ajudar a resolver problemas com documentação.

Ao pessoal do LABMEC da UNESP de Botucatu a linda Livia por toda sua alegria contagiante, à Jack, ao Andrey e ao Sérgio (PEY) por serem tão acolhedores. Agradeço

especialmente ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino que sempre me deixou frequentar o laboratório e sempre me tratou como se eu fosse uma orientada.

A Dona Tera que cuidava da cozinha do Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu que sempre me atendia com tanto amor.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia e Anatomia da UNESP de Botucatu, especialmente ao Ricardo, ao José, ao Gelson e ao Paulo pelos grandes ensinamentos e disposição em ajudar-me.

Ao pessoal da ABU de Botucatu por me acolherem tão bem em Botucatu.

As meninas do pensionato Mariquinhas de Campinas Ingrid, Dani, Lari, Alice, Bruna e Natany por toda amizade, conversas, risadas e cafés.

As minhas amigas conterrâneas Érica Cristina e Mirian Matsumoto por me ajudarem e acompanharem de perto essa caminhada, foi uma benção poder contar com vocês em Campinas! Obrigada de todo meu coração por todos os momentos incríveis que vivemos nessa fase das nossas vidas!

A toda equipe que auxilia na secretaria da pós-graduação, em especial agradeço ao secretário Davi Muller por sempre me atender e responder aos meus e-mails e sempre esclarecer minhas dúvidas eu agradeço imensamente, suas informações sempre foram fundamentais.

A todos os membros que fizeram parte da minha banca de qualificação (Prof. Dr. Wellerson Scarano, Prof. Dr. Robson Carvalho e Prof. Dr. Gustavo Chuffa) por todas as contribuições para a conclusão deste trabalho, pois as sugestões foram de extrema relevância.

Aos animais experimentais “Foste para nós vítimas solicitadas pela ciência para benefício da humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre: Muito obrigada” (autor desconhecido).

A FAPESP pela bolsa (2012/16880-7) concedida e por me manter em dedicação exclusiva.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra, não menos importante que ninguém, estiveram comigo nesta longa jornada.

Lista de abreviaturas

ATF2/cjun Fator Ativador de Transcrição 2 cjun

ARE Elemento de resposta antioxidante

AP Proteína de ativação

AUM Unidades Assimétricas de Membrana

BCG *Bacillus Calmette – Guerin*

CB Câncer de bexiga urinária

CBNMI Câncer de bexiga não-músculo invasivo

CFU-GM Unidade formadora de colônia - granulócitos/macrófagos

CD Cluster de Diferenciação

COX Ciclo Oxigenase

CPR Proteína C reativa

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DMSO Dimetilsulfóxido

DSC Calorimetria Diferencial de Varredura

DSC Desmocolina

DSG Desmogleína

EGFR Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

ERKs Proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular

EROs Espécies reativas de oxigênio

ECM Matrix Extra Celular

FGF Fator de crescimento fibroblástico

GMCSF Fator estimulante de colônias de macrófagos

HIF Fator transcricional indutor de hipóxia

IFN Interferon

IP Proteína Induzível

IRF 3 Fator Regulador de Interferon 3

IL Interleucina

iNOS Síntese de Óxido Nítrico Induzível

INCA Instituto Nacional do Câncer

ICAM Molécula de Adesão Intercelular

JNK cJun N-terminal Quinase

LAM lipoarabinomanana

LM lipomannan

MAPK Proteína Kinase Ativada por Mitógeno

MyD88 Fator de Diferenciação Mielóide 88

MMPs Metaloproteinases de matriz

MNU N-metil-N-nitrosureia

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

NADPH Hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NO Óxido Nítrico

NCI Instituto Nacional do Câncer, EUA

NF- κ B Fator de transcrição nuclear Kappa Beta

NRF2 Fator de transcrição eritróide 2

NK *Natural Killer*

NOX Número de oxidação

PAMPs Padrão Molecular Associado a Patógeno

P-MAPA Agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio

pH Potencial Hidrogeniônico

PDI Índice de Polidispersidade

RPMI Roswell Park Memorial Institute

PPR Receptores de Reconhecimento Padrão

RTU Ressecção transuretral

SBR Sulforrodamina B

SFB Soro Fetal Bovino

SUS Sistema Único de Saúde

TRAIL Fator de necrose tumoral-alfa-relacionados ligante indutor de apoptose

TRIF Domínio TIR contendo adaptador-indutor de Interferon- β

TIR Toll/IL-1 receptor

TLRs Receptores de toll-like

TNF Fator de necrose tumoral

TCA ácido tricloroacético

UP Uroplaquina

VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

VCAM Molécula de Adesão Celular Vascular

vMAF Fibrossarcoma Músculo Aponeurótico

XRD Raio X de Difração

XRF Raio X de Fluorescência

WHO Organização Mundial de Saúde

RESUMO

A baixa eficácia dos tratamentos e as altas taxas de recorrência do câncer de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) podem estar relacionadas aos baixos efeitos das terapias atuais sobre os mecanismos de reparo tecidual, espécies reativas de oxigênio (EROS) e angiogênese e, dentre essas terapias, a mais eficaz é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) que, entretanto, ocasiona efeitos colaterais de intensidades variadas. Desta forma, o desenvolvimento de novas moléculas ou o melhoramento de fármacos já existentes que reduzam o número de instilações intravesicais, as taxas de recorrência e progressão tumoral e os efeitos colaterais é muito relevante. Diante deste cenário destaca-se o imunomodulador P-MAPA abrindo uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o CBNMI. Assim, os objetivos principais deste estudo foram caracterizar e comparar os efeitos histopatológicos e moleculares do imunomodulador P-MAPA, estabilizado com quitosana e pluronic com a imunoterapia com BCG no tratamento da progressão do CBNMI induzido em ratos. Para tal, o P-MAPA foi nanonizado utilizando a quitosana e o pluronic como estabilizante nas formulações. A caracterização das formulações se deu por técnicas microscópicas, diâmetro e carga superficial, análises térmicas e de raio X. Para a avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA estabilizado comparada com BCG utilizou-se 35 ratas da linhagem Fischer 344. Desses animais, 30 foram submetidos a indução química do CBNMI através da instilação intravesical de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) e os outros 5 animais foram considerados como Grupo (controle) e receberam solução fisiológica. Duas semanas após a última dose de MNU, dividiu-se os animais em 6 grupos a saber, grupo câncer (MNU) animais que foram submetidos a instilação intravesical de MNU e receberam solução fisiológica, grupo MNU+BCG, animais que foram tratados com BCG 10^6 UFC (40 mg), Grupo MNU+P-MAPA-Micro Pluronic, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA disperso em solução aquosa de Pluronic F68 (5% m/v), grupo MNU+P-MAPA-Micro Quitosana, animais que foram tratados com uma dose de 1 mg/mL de P-MAPA disperso em solução aquosa de Quitosana (1,33%); grupo MNU+P-MAPA-Nano Pluronic, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA nanonizado disperso em solução aquosa de Pluronic F68 e grupo MNU+P-MAPA-Nano Quitosana, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA nanonizado disperso em solução aquosa de Quitosana. Todos os tratamentos foram administrados por via intravesical por 6 semanas consecutivas. Após o tratamento, todas as bexigas foram coletadas e submetidas às análises histopatológicas e *Western Blotting*. O presente estudo comprovou que a utilização do Pluronic como estabilizante para o desenvolvimento de formulações de compostos terapêuticos para o tratamento intravesical de câncer de bexiga mostrou-se eficiente protegendo o produto de alteração ou perdas pela variação do pH urinário. Ainda, nossos resultados demonstraram que as formulações com P-MAPA nano Pluronic e P-MAPA micro Pluronic promoveram ativação equivalente do sistema imune inato e adaptativo mediada pelos receptores *Toll-like* 2 e 4 em relação ao BCG, resultando no aumento da via de sinalização para interferons, desacelerando o processo de angiogênese, culminando com significativa regressão do CBNMI. Assim, o P-MAPA nanonizado na presença de Pluronic é um potencial candidato para o tratamento do CBNMI.

Palavras-chave: câncer de bexiga, P-MAPA, imunoterapia, nanotecnologia, urologia.

ABSTRACT

The low effectiveness of treatments and high recurrence rates of bladder cancer noninvasive muscle (CBNMI) may be related to low effects of current therapies on the mechanisms of tissue repair, oxygen reactive species (EROS) and angiogenesis, and among these therapies, the most effective is immunotherapy with BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) which, however, causes side effects of varying intensities. Thus, the development of new molecules or improving existing drugs that reduce the number of intravesical instillations, recurrence rates and tumor progression and side effects is very important. This scenario highlights the P-MAPA immunomodulator opening a new perspective to fight some types of cancers, including CBNMI. Thus, the aims of this study were to characterize and compare the histopathologic and molecular effects of immunomodulator P-MAPA, stabilized with chitosan and pluronic with immunotherapy with BCG in the treatment of progression of CBNMI induced in rats. To this end, the P-MAPA was nanosized using chitosan and pluronic as a stabilizer in the formulations. Characterisation of the formulations are given by microscopic techniques, diameter, surface charge, thermal analysis and X-ray. To evaluate the antitumor activity of P-MAPA stabilized compared with BCG was used 35 female Fisher-344 rats. Of these animals, 30 underwent chemical induction CBNMI by intravesical instillation of 1.5 mg / kg of N-methyl-N-Nitrosourea (MNU), and the other 5 animals were considered Group (control) and received physiological solution. Two weeks after the last dose of MNU, divided animals into 6 groups namely cancer group (MNU) animals underwent intravesical instillation of MNU and received physiological solution, MNU + BCG group animals were treated with BCG 10^6 CFU (40 mg) group MNU + P-MAPA Micro Pluronic, animals were treated with a dose of 1mg / mL P-MAPA dispersed in aqueous solution of Pluronic F68 (5% w / v), group MNU + P-MAPA Micro Chitosan, animals were treated with a dose of 1mg / mL P-MAPA dispersed in aqueous solution of chitosan (1.33%); Group MNU + P-MAPA-Nano Pluronic, animals were treated with a dose of 1mg / mL P-MAPA nanosized dispersed in aqueous solution of Pluronic F68 and Group MNU + P-MAPA-Nano Chitosan, animals were treated with a dose of 1mg / mL P-MAPA nanosized dispersed in aqueous solution of chitosan. All treatments were administered via intravesical for 6 consecutive weeks. After treatment, all bladders were collected and subjected to histological analysis and Western Blotting. This study showed that the use of Pluronic as a stabilizer for the development of therapeutic compounds formulations for intravesical treatment of bladder cancer was efficient protecting the product change or loss by varying the urine pH. Furthermore, our results demonstrated that formulations P-MAPA nano Pluronic and P-MAPA micro Pluronic promoted equivalent activation of the innate and adaptive immune system mediated by Toll-like receptors 2 and 4 compared to BCG, resulting in increased signaling pathway to interferons, slowing the process of angiogenesis, culminating in significant regression of CBNMI. Thus, nanosized P-MAPA in the presence of Pluronic is a potential candidate for treatment of CBNMI.

Keywords: bladder cancer, P-MAPA, immunotherapy, nanotechnology, urology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sistema Urinário	14
1.2 Carcinoma de Bexiga Urinária.....	16
1.2.1 Fatores de Risco	17
1.2.2 Tipos de Carcinoma de Bexiga Urinária	18
1.2.3 Classificação histológica	19
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos Gerais	25
3.2 Objetivos Específicos	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Capítulo 1: Desenvolvimento de Novas Modalidades Terapêuticas no Tratamento do Carcinoma de Bexiga Urinária: Imunomodulador P-MAPA e Nanotecnologia	28
4.2 Capítulo 2: P-MAPA e o carcinoma de bexiga urinária não músculo invasivo (CBNMI): Mecanismos de reparo de lesão, EROS e angiogênese	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	112
ANEXO 1 – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA	115
ANEXO 2 - CARACTERIZAÇÃO DO P-MAPA	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Urinário

O sistema urinário humano é constituído por um par de rins e ureteres pareados, pela bexiga e a uretra na linha média. (Hallgrímsson et al., 2003) (**Figura 1**). As porções pélvicas do sistema urinário são constituídas pelas partes terminais dos ureteres, pela bexiga urinária e pela parte proximal da uretra (Drake et al., 2005).

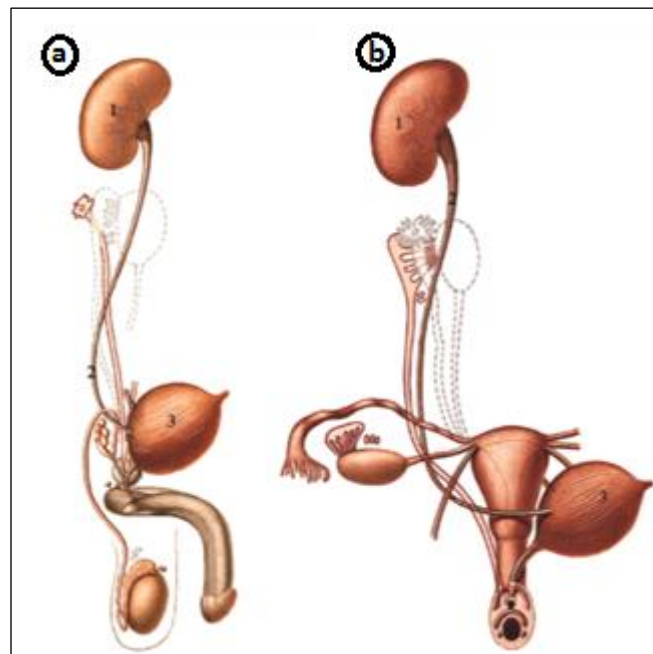


Figura 1. Órgãos do sistema urinário nos gêneros masculino e feminino: (1) rim, (2) ureter e (3) bexiga (Sobotta, 2012).

Os rins apresentam o formato de um grão de feijão, pesam cerca de 115-170 g cada podendo variar de um indivíduo a outro e estão localizados em posição retroperitoneal na região da parede posterior do abdome (Tisher e Madsen, 2000; Drake et al., 2010).

Os ureteres são tubos musculares que se estendem desde o hilo do rim para a superfície posterior da bexiga urinária e tem a função de transferir a urina dos rins para a bexiga (Hallgrímsson et al., 2003). Cada ureter mede aproximadamente 25 cm de comprimento em adultos (Moinuddin e Dhanda, 2015).

Os ureteres entram na cavidade pélvica, provenientes do abdome, passando através da abertura superior da pelve. De cada lado, o ureter atravessa a abertura superior da pelve e entra na cavidade pélvica, anteriormente à bifurcação da artéria ilíaca comum. A partir deste ponto,

segue pela parede dos assoalho pélvicos para se unir à base da bexiga urinária (Drake et al., 2005).

No homem, são cruzados pelos ductos deferentes anterossuperiores; na mulher, essa porção dos ureteres penetra no ligamento cervical lateral e situa-se numa pinça vascular constituída, acima, pela artéria uterina e abaixo, pela artéria vaginal (Júnior, et al., 2010)

A bexiga urinária encontra-se em posição subperitoneal e está constituída pelo corpo (corpo da bexiga), que termina no ápice da bexiga, voltado para cima, e que inferiormente possui um fundo (fundo da bexiga) e neste o óstio interno da uretra forma, com as desembocaduras os dos dois ureteres (óstios dos ureteres) de ambos os lados, o trígono da bexiga (Sobotta, 2012).

A bexiga urinária tem a função de armazenar a urina e é a estrutura mais anterior das vísceras pélvicas tendo a capacidade média de armazenar 700 a 800 mL de urina; porém com 250 a 500 mL já ocorre urgência urinária (Drake et al., 2005; Goldman e Ausiello, 2005). Quando vazia apresenta formato tetraédrica situando-se inteiramente na cavidade pélvica apresentando um ápice, uma base, uma superfície superior e duas superfícies inferolaterais, porém quando cheia ela se expande superiormente na cavidade abdominal (Drake et al., 2005).

A parede da bexiga urinária é composta internamente por uma túnica mucosa (epitélio transicional) denominada urotélio. Externamente ao urotélio encontra-se a lâmina própria formada basicamente de tecido conectivo e uma camada muscular lisa que divide-se em longitudinal interna, circular média e longitudinal externa e, sendo ativadas pela parte parassimpática da divisão autônoma do sistema nervoso, e na região mais superior essas camadas misturam-se o que possibilita uma boa complacência e esvaziamento (Sobotta, 2012; Júnior, et al., 2010). Externamente é composta por uma túnica adventícia, ou – em posição cranial – por uma túnica serosa, formada pelo peritônio (Sobotta, 2012).

O ápice da bexiga urinária é dirigido para a parte superior da sínfise púbica, uma estrutura conhecida como ligamento umbilical mediano (contém o uraco, um vestígio do alantoide do futuro seio urogenital no cordão umbilical), continua a partir deste ápice, superiormente, acima da parede anterior do abdome, até o umbigo (Sobotta, 2012; Drake et al., 2005).

1.2 Carcinoma de Bexiga Urinária

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO*) o câncer é um nome genérico dado a um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento descontrolado de células, que podem invadir e se espalhar para diversos locais do corpo podendo ter consequências graves para a saúde. O câncer é uma das principais causas de morte no mundo sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012 (World Cancer Report, 2014).

O câncer de bexiga (CB) é uma doença que envolve o urotélio. O urotélio consiste de células epiteliais que revestem estruturas como a pélvis renal, os ureteres, a bexiga e a uretra (Pang e Catto, 2013). Segundo a Sociedade Americana do Câncer o CB é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário nos Estados Unidos. O CB é uma doença heterogênea caracterizada por instabilidade genética em que muitas variáveis influenciam a probabilidade de reincidência e progressão. Em 2006 a Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) descreveu um sistema de pontuação com seis variáveis para o Câncer de Bexiga não Músculo Invasivo (CBNMI): grau, estágio, CIS, multiplicidade de lesão, tamanho e taxa de recorrência. Entretanto, novos marcadores tumorais estão sendo investigados para aumentar a precisão deste sistema de pontuação (Sylvester et al., 2006).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil serão, em 2016, 9.670 novos casos, sendo 7.200 em homens e 2.470 em mulheres. Sendo que em 2013 foram 3.642 mortes, sendo 2.542 homens e 1.099 mulheres.

A Sociedade Americana do Câncer estima que haverá 76.960 novos casos de CB nos Estados Unidos em 2016, sendo 58.950 em homens e 18.010 em mulheres. A estimativa também prevê que haverá 16.390 mortes por CB onde 11.820 serão homens e 4.570 serão mulheres.

Mais de 70% da incidência de CB é superficial (pTa e pT1), tumor não-invasivo, e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Kroft e Oyasu, 1995; Reis et al., 2009). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Shimada et al., 2011).

Atualmente o tratamento recomendado para o CBNMI compreende a ressecção transuretral, geralmente seguida por quimioterapia intravesical com Mitomicina C ou imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) para evitar recorrência e/ou progressão e nos casos de carcinoma de bexiga músculo invasivo o tratamento é a cistectomia radical e/ou a quimioterapia e/ou a radioterapia. (Azevedo, 2015) (**Figura 2**).

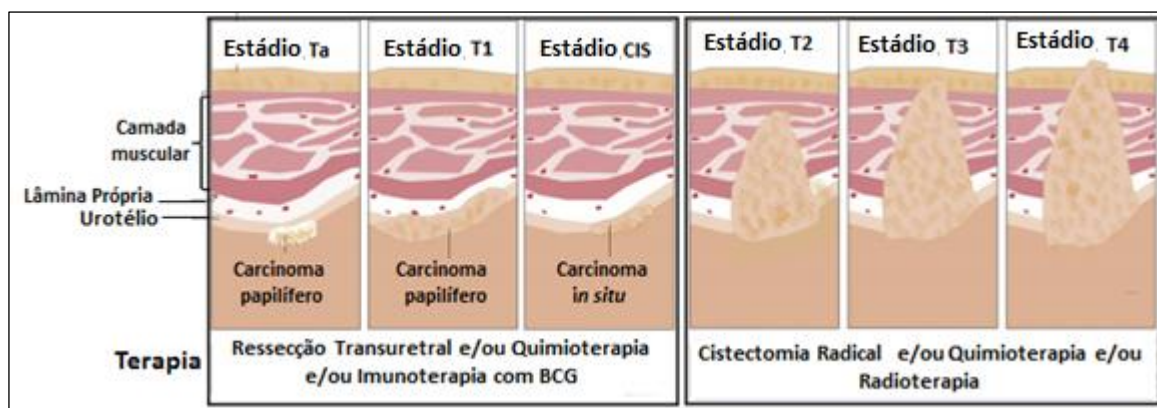


Figura 2. Câncer de bexiga: Estádios e terapia recomendada. (Adaptado de Azevedo, 2015).

1.2.1 Fatores de Risco

Segundo dados do registro da base populacional do INCA o maior fator de risco para o desenvolvimento do CB é o tabagismo, sendo responsável por cerca de 66% de novos casos em homens e 30% em mulheres. Na meta-análise de estudos epidemiológicos de Zeegers e colaboradores (2000) sobre o impacto das características do tabagismo ao risco de câncer do trato urinário, o cigarro foi apontado como um fator que aumenta substancialmente o risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga. O cigarro possui dezenas de substâncias tóxicas, dentre elas aminas aromáticas e compostos N-nitrosos análogos do MNU (*N-metil-N-nitrosouréia*) um potente carcinógeno (Antonova et al., 2015)

Outro fator de risco potencial para o desenvolvimento do câncer da bexiga é a exposição ocupacional às aminas aromáticas por trabalhadores de indústrias de borracha, têxtil e de tinta e a infecção por *Schistosoma haematobium*, sendo este endêmico em países mediterrâneos como o Egito (Vineis, 1994, INCA, 2015).

A exposição a certas substâncias tais como o arsênio, que pode estar presente em águas de abastecimento, o ácido aristolóquico presente em muitas plantas de uso medicinal e a pioglitazona presente em fármacos para tratamento de diabetes estão associados como um fator de risco (Poon et al., 2015; Rosenquist e Grollman, 2016).

De acordo com a Sociedade Americana do Câncer a ingestão reduzida de líquidos pode ser um fator de risco, pois um indivíduo que ingere quantidades elevadas de líquidos, principalmente água, tende a eliminar substâncias químicas mais rapidamente levando em

consideração que este tenderá a esvaziar sua bexiga com mais frequência e também diluirá mais rápido essas substâncias tóxicas.

Existem fatores de risco que não dependem do estilo de vida do indivíduo tais como o histórico familiar e a predisposição genética (Sadetzki et al., 2000; Antonova et al., 2001).

Em geral, o câncer da bexiga é cerca de 3 a 4 vezes mais comum em homens do que em mulheres (Nezos et al., 2009). Por outro lado, a sobrevida das mulheres é pior com esse tipo de tumor. Especula-se que a alta agressividade do câncer de bexiga nas mulheres é decorrente do desbalanço hormonal, o qual surge a partir da quinta década de vida. Embora a bexiga urinária seja secundariamente regulada por hormônios sexuais esteroides, o urotélio normal e os tumores uroteliais são responsivos aos andrógenos e estrógenos (Garcia et al., 2015).

Garcia et al. (2015) demonstraram pela primeira vez em ratas induzidas quimicamente ao CBNMI que os níveis proteicos aumentados da ubiquitina ligase *SIAH-2* supra regularam os receptores androgênicos e diminuíram os níveis dos receptores estrogênicos, culminando com o escape das células uroteliais neoplásicas do sistema imune. Esses mesmos autores verificaram que os níveis dos receptores do sistema imune, *toll-like receptors*, foram diminuídos no CBNMI e associaram esse efeito ao aumento dos níveis de *SIAH-2* e dos receptores androgênicos.

1.2.2 Tipos de Carcinoma de Bexiga Urinária

A bexiga urinária é formada por várias camadas onde são encontrados diferentes tipos de células e os diferentes tipos de carcinoma estão divididos de acordo com o tipo de células onde se iniciam. Segundo o INCA e a WHO essas alterações celulares levam ao desenvolvimento de três tipos de câncer:

Carcinoma urotelial: representa a maioria dos casos e começa nas células do tecido mais interno da bexiga que se diferem das células uroteliais normais por apresentarem mais camadas epiteliais, maturação celular, nucléolos proeminentes e mais mitoses. Células uroteliais também estão presentes em outras partes do trato urinário, como na pelve renal, nos ureteres e na uretra. Sendo assim, pacientes com esse tipo de carcinoma de bexiga, em muitos casos podem ter tumores nestes lugares e dessa forma, todo o trato urinário deve ser verificado. (INCA, 2016; Matheus, 2010, Sociedade Americana do Câncer, 2016)

Carcinoma de células escamosas: afetam as células delgadas e planas que podem surgir na bexiga depois de infecção ou irritação prolongadas. Prevalendo em países do mediterrâneo o que pode estar associado a infecção crônica da bexiga por *Schistosoma haematobium*, endêmico nessas regiões. Nesses casos, os ovos do *Schistosoma* podem atingir a

parede vesical e causar processo inflamatório crônico e consequentemente causar uma metaplasia escamosa. Quase todos os carcinomas de células escamosas são invasivos (INCA, 2016; Matheus, 2010, Sociedade Americana do Câncer, 2016).

Adenocarcinoma: se inicia nas células glandulares (de secreção) que podem se formar na bexiga depois de um longo tempo de irritação ou inflamação. Em geral, adenocarcinomas ocorrem na cúpula vesical e são tumores pouco diferenciados podendo ser classificados em primário, de uraco ou não uraco, e secundário ou metastático com etiologia de: reto, estômago, endométrio, mama, próstata e ovário. Adenocarcinomas de uraco tem pior prognóstico que não-uraco e podem apresentar metástases precocemente para linfonodos ilíacos inguinais, omento, fígado, pulmões e ossos. Quase todos os adenocarcinomas são invasivos (INCA, 2016; Matheus, 2010, Sociedade Americana do Câncer, 2016)

Quando o câncer se limita ao urotélio, é chamado de superficial. O câncer que começa nas células de transição pode se disseminar através do revestimento da bexiga, invadir a parede muscular e disseminar-se até os órgãos próximos ou gânglios linfáticos, transformando-se num câncer invasivo.

1.2.3 Classificação histológica

Até 1998 os carcinomas uroteliais eram representados pela classificação de Koss em graus 1, 2 e 3 e de acordo com essa classificação, quanto maior o grau, maior o padrão de indiferenciação celular (Matheus, 2010). Dessa maneira, quanto mais uma célula tumoral apresentasse características de uma célula primordial ou normal ela seria considerada mais diferenciada e, consequentemente, menos agressiva do contrário ela seria considerada menos diferenciada e mais agressiva.

Porém, em 1998, o consenso entre a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO*) e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (*International Society of Urological Pathology, ISUP*) propôs uma nova classificação que permanece até os dias atuais (Mostoffi et al., 1973; Epstein, et al., 1998, Epstein, 2003).

Tabela 1. Classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (WHO) de 1973 e 2004

WHO classificação 1973	WHO/ISUP classificação 2004
Grau 1: bem diferenciado	Carcinoma urotelial papilífero de baixo grau
Grau 2: moderadamente diferenciado	Carcinoma urotelial papilífero de alto grau
Grau 3: pouco diferenciado	Carcinoma urotelial papilífero de alto grau

Entre outras mudanças, a principal diferença foi o agrupamento dos tumores: grau 1 – carcinoma urotelial papilífero de baixo grau e graus 2 e 3 – carcinoma papilífero de alto grau (**Tabela 1**). Com relação ao prognóstico, tumores de alto grau apresentam maior possibilidade de recidiva e progressão e, portanto, de piores prognósticos quando comparados aos de baixo grau histológico (Matheus, 2010).

1.2.4 Estadiamento

O estadiamento histopatológico do CB serve para avaliar seu grau de disseminação e é determinado pela profundidade de invasão tumoral da parede vesical (comprometimento da camada muscular) (Matheus, 2010; Pompeo et al., 2008; INCA, 2016). Esse diagnóstico dependerá da ressecção transuretral (RTU) do tumor, por via endoscópica, para seu diagnóstico correto. Fragmentos de ressecção superficiais e profundos devem ser analisados separadamente (**Figura 3, Tabela 2**) (Matheus, 2010). O sistema TNM, da Organização Mundial da Saúde, é a referência para essa classificação, pois este é aceito mundialmente (Epstein et al., 1998; INCA, 2016).

Tabela 2. Classificação do Câncer de Bexiga

Classificação TMN 2002 do Câncer de Bexiga
Tumor primário T TX: Tumor primário não pode ser avaliado 0: Nenhuma evidência de tumor primário Ta: Carcinoma papilar não invasivo (restrito a mucosa) Tis: Carcinoma <i>in situ</i> T1: Tumor com invasão subepitelial (invasão da lâmina própria) T2: Tumor com invasão da musculatura própria pT2a: Superficial (metade interna) pT2b: Profunda (metade externa) T3: Tumor invade tecido perivesical pT3a: Microscopicamente pT3b: Macroscopicamente (massa extravesical) T4: Tumor invade qualquer dos órgãos adjacentes pT4a: Tumor invade a próstata, útero ou vagina pT4b: Tumor invade a parede pélvica-abdominal
Linfonodos regionais (N) NX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados N0: Nenhuma metástase para linfonodo regional N1: Metástase linfonodos ≤ 2 cm N2: Metástase linfonodos ≤ 5 cm N3: Metástase linfonodos > 5 cm
Metástases a distância (M) MX: Metástases a distância não podem ser avaliadas M0: Nenhuma metástase a distância M1: Metástases a distância

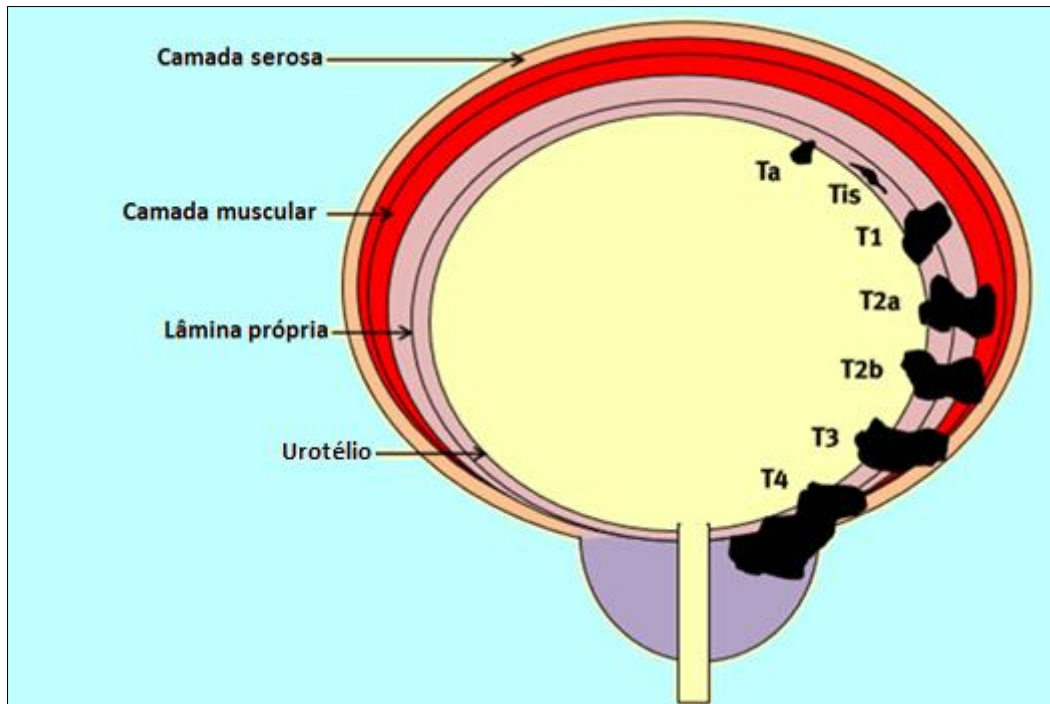


Figura 3: Classificação do câncer de bexiga. (Adaptado de Pang e Catto, 2013)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o conjunto dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- O P-MAPA em baixa dosagem na forma nanométrica apresenta um grande potencial frente ao CBNMI.
- O P-MAPA foi efetivo frente ao CBNMI induzido quimicamente em ratas visto que se observou lesões benignas em quase todos os animais tratados com a formulação de P-MAPA com pluronic F68.
- Houve ativação de fatores reparadores de lesão e inibição de processos angiogênicos;
- Houve inibição de enzimas que contribuem para o estresse oxidativo através da ativação de contra-reguladores.

6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AZEVEDO, R.; FERREIRA, J. A.; PEIXOTO, A.; NEVES, M.; SOUSA, N.; LIMA, A.; SANTOS, L. L. Emerging antibody-based therapeutic strategies for bladder cancer: A systematic review. *J. Controlled Release*, v.214, p. 40–61, 2015.

ANTONOVA O, TONCHEVA D, GRIGOROV E. Bladder cancer risk from the perspective of genetic polymorphisms in the carcinogen metabolising enzymes. *J. BUON.*, v. 20, p.1397–1406, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2016. Atlanta: American Cancer Society; 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Bladder cancer risk factors. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/bladder-cancer-risk-factors>. Acesso em: 20 abr. 2016.

DRAKE, R.L.; VOGL, W.; MITCHELL, A. Gray's anatomia para estudantes. Rio de Janeiro: Elsevier. 1103p., 2010.

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

EPSTEIN, J. I. The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Crit. Ver. Oncol. Hematol.*, v. 47, p.83-89, 2003.

GOLDMAN, Lee; AUSIELLO, Dennis. CECIL: Tratado de Medicina Interna. 22ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

HALLGRÍMSSON, B.; BENEDIKTSSON, H.; VIZE, P. D. Anatomy and histology of the human urinary system. *The Kidney*, Chapter 11, p. 149-164, 2003.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/Comentarios/Parte466_registro_de_base_populacional_completo.pdf. Acesso em 23 nov. 2015.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer de bexiga. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>. Acesso em 23 nov. 2015.

JÚNIOR, A. N.; FILHO, M. Z.; REIS, R. B. Urologia fundamental. São Paulo: Planmark. 420p., 2010.

MATHEUS, E. W. Cap 17: Câncer de Bexiga Pta, Ptis e Pt1 in Urologia fundamental. editor Miguel Zerati Filho, Archimedes Nardozza Júnior, Rodolfo Borges dos Reis. São Paulo:Planmark, 2010.

MOINUDDIN, Z.; DHANDA, R. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. *Elsevier*, v.16, Issue 6, p. 247-252, 2015.

MOSTOFFI, F.K.; SOBIN, L. H.; TORLONI, H. Histologic typing of urinary bladder tumours. International Classification of Tumours 19. Geneva: WHO; 1973

NEZOS A, PISSIMISIS N, LEMBESSIS P, SOURLA A, DIMOPOULOS P, DIMOPOULOS T, TZELEPIS K, KOUTSILIERIS M. Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, v. 35, p. 272-279, 2009.

PANG, K. H.; CATTO, J. W. F. Bladder cancer. Renal and Urological Surgery II, *ELSEVIER*, p. 523-529, 2013.

POON, S. L.; HUANG, M. N.; CHOO, Y.; McPHERSON, J. R.; YU, W.; HENG, H. L; GAN, A.; MYINT, S. S.; SIEW, E. Y.; LER, L. D.; NG, L. G.; WENG, W. H.; CHUANG, C. K.; YUEN, J. S.; PANG, S. T.; TAN, P.; TEH, B. T.; ROZEN, S.G.; Mutation signatures implicate aristolochic acid in bladder cancer development. *Genome Med*, v. 7, p. 1-10, 2015.

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

ROSENQUIST, T. A.; GROLLMAN, A. P. Mutational signature of aristolochic acid: Clue to the recognition of a global disease. *DNA Repair*, v.44, p.205-211, 2016.

SADETZKI, S.; BENSAL, D.; BLUMSTEIN,T.; NOVIKOV, I.; MODAN, B. Selected risk factors for transitional cell bladder câncer. *Med. Oncol.*, v. 17, p. 179-182, 2000.

SYLVESTER, R. J.; van der MEIJDEN, A. P.; OOSTERLINCK, W.; WITJES, J. A.; BOUFFIOUX, C.; DENIS, L.; NEWLING, D. W.; KURTH, K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur. Urol.*, v. 49, issue 3, p. 466-477, 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, p.22, 2011.

SOBOTTA: Atlas de anatomia humana: Órgãos internos, volume 2/ coordenado por F Paulsen e J. Waschke; traduzido por Marcelo Sampaio Narciso; sob a supervisão de Adilson Dias Sanches – Rio de Janeiro: Guanabara Koofan, 2012.

TISHER, C. C.; MADSEN, K. M. Anatomy of the kidney. In “Brenner and Rector’s the Kidney” (B. M. Brenner ed.), p. 3–67. Saunders, Philadelphia, 2000.

ZEEGERS, M.P.; TAN, F.E.; DORANT, E. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, v.89, p.630–639, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): progress in research, 1989-1990. Geneva, p. 41-47, 1991.(Programme Report, 10)