



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



Caracterização dos Mecanismos de Ação da Imunoterapia Intravesical com P-MAPA Envolvendo as Vias de Sinalização dos Receptores *Toll-like* (TLR) 2 e 4 na Progressão do Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo

Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha

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 Estrutural e Funcional

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização dos Mecanismos de Ação da Imunoterapia Intravesical
com P-MAPA Envolvendo as Vias de Sinalização dos Receptores *Toll-
like* (TLR) 2 e 4 na Progressão do Câncer de Bexiga Não-Músculo
Invasivo

Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha

Orientador: Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Co-orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

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
Estrutural e Funcional

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

**BOTUCATU – SP
2015**

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

Rocha, Ana Beatriz Missio Vieira da.

Caracterização dos mecanismos de ação da imunoterapia intravesical com P-MAPA envolvendo as vias de sinalização dos receptores Toll-like (TLR) 2 e 4 na progressão do câncer de Bexiga não-músculo invasivo / Ana Beatriz Missio Vieira da Rocha. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Wagner José Fávoro

Coorientador: Roger Chammas

Capes: 20601000

1. Bexiga - Câncer - Tratamento. 2. Imunoterapia. 3. Receptores Toll-like. 4. Animais transgênicos.

Palavras-chave: Animais knockout; Câncer de bexiga; Imunoterapia; Receptores Toll-like.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Vera, e a minha irmã Mariana, por contribuírem para que eu alcançasse meus objetivos. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

A todos os ratos, camundongos e qualquer outro animal de experimentação que cederam suas vidas em prol da ciência. Sem eles não teríamos construído todo o conhecimento que temos hoje.

Ao meu orientador Dr. Wagner José Fávaro, agradeço imensamente, pela oportunidade, paciência, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Ao meu co-orientador Dr. Roger Chammas, agradeço pela oportunidade, por ceder os animais *knockout* e partilhar um pouco de sua experiência na conclusão desse projeto.

À Farmabrilis e ao Dr. Iseu Nunes por fornecer o inovador imunomodulador P-MAPA.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, João e Vera, pelo amor incondicional. Pelas inúmeras caronas, por não me cobrarem aluguel e por aguentarem o brinde que late que eu trago dos congressos. Cada objetivo alcançado é para vocês.

A minha irmã, Mariana, e meu cunhado, Bruno. Por me acolherem na casa de vocês, me alimentarem, me ouvirem e deixar minha vida mais feliz.

Às amigas do laboratório, Ana, Miriam, Sophia e Queila. Sem vocês não teria graça. Especialmente à Ana e Miriam, por me ajudarem, me ouvirem, pelos sábados e domingos no laboratório, pelas risadas, por me acolherem na casa de vocês, pelo tereré pós-laboratório.

Aos amigos do laboratório LCURGIM que me ajudaram no cotidiano do laboratório, especialmente ao Patrick, pelas eutanásias, viagens para São Paulo e sempre uma companhia agradável.

Às amigas Natacha, Renata, Lígia e Nathalia. Mesmo distante me ouvem e me ajudam sempre que possível. Especialmente à Natacha por não me deixar sozinha em Campinas, e à Lígia por sempre me acolher muito bem em Botucatu.

Lista de abreviaturas

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
CB	Câncer de bexiga urinária
CBNMI	Câncer de bexiga não-músculo invasivo
ERKs	Proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular
GMCSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IκB	Inibidores NF-κB
IKKs	Proteínas quinases IκB
IL	Interleucina
IRFs	Fatores regulatórios de interferon
JNKs	Proteínas quinases c-jun-N-terminal
MAPKs	Proteínas-quinases ativadas por mitógeno
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MNU	N-metil-N-nitrosouréia
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
NK	<i>Natural killer</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
P-MAPA	Agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio
RTU	Ressecção Transuretral
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	Adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon B
WT	<i>Wild Type</i>

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. Carcinoma de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)	8
1.2 – Via de Sinalização dos Receptores <i>Toll Like</i> (TLR), NF- κ B e p53	9
1.3 – Imunoterapias no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo.....	13
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1 – Animais e Procedimento Experimental	19
2.2 – Análises Histopatológicas.....	20
2.3 – Extração de Proteínas e <i>Western Blotting</i>	21
2.4 - Análises Estatísticas	22
3. Resultados.....	23
3.1 Análises Histopatológicas.....	23
3.1.1 Animais <i>Wild Type</i>	23
3.1.2 Animais TLR4-/-	25
3.1.3 Animais MyD88-/-	26
3.2 Análises de <i>Western Blotting</i>	29
3.2.1 Animais <i>Wild Type</i>	29
3.2.2 Animais TLR4-/-	34
3.2.3 Animais MyD88-/-	35
4. Discussão	41
5. Conclusões.....	51
6. Referências Bibliográficas.....	52
7. Anexos.....	60

Resumo

Agonistas dos receptores *Toll-like* (TLRs) podem representar candidatos promissores a serem desenvolvidos como medicamentos contra o câncer. Atualmente, a terapia mais eficaz para o câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), embora sua utilização esteja limitada a efeitos colaterais de intensidades variadas. Diante deste cenário destaca-se o P-MAPA, que por sua grande versatilidade e mínima citotoxicidade, abre uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o CBNMI. Assim, os objetivos principais deste estudo foram caracterizar os efeitos histopatológicos e moleculares da imunoterapia intravesical com P-MAPA envolvendo as vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 no tratamento do CBNMI induzido quimicamente em camundongos selvagens (*wild type* - WT) e *knockouts* (-/-) para TLR4 e MyD88. Os efeitos da imunoterapia com P-MAPA foram comparados com o tratamento com BCG. Foram utilizados 20 camundongos fêmeas de cada linhagem (WT, TLR4-/- e MyD88-/-), todos com 60 dias de idade e mantidos no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina/USP – São Paulo. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais, para cada linhagem: Grupo Controle (CTL): recebeu uma dose intravesical de solução fisiológica por 3 semanas consecutivas; Grupo MNU: recebeu uma dose intravesical de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) a cada 15 dias, totalizando 3 doses; Grupo MNU+BCG: recebeu uma dose intravesical de BCG por 3 semanas consecutivas; Grupo MNU+P-MAPA: recebeu uma dose intravesical de P-MAPA por 3 semanas consecutivas. Após 09 semanas de experimento, as bexigas urinárias foram coletadas e submetidas às análises histopatológicas e *Western Blotting*. O presente trabalho demonstrou que a imunoterapia com P-MAPA promoveu distinta ativação do sistema imune inato mediada por TLRs 2 e 4 em relação ao BCG, resultando no aumento da via de sinalização para interferons (TRIF, IRF3, IFN- α e IFN- γ) e restauração dos níveis protéicos de p53. Já a ativação do sistema imune por BCG resultou no aumento da sinalização de citocinas inflamatórias (IKK- α , IKK- β , NF κ -B e IL-6), a qual não foi efetiva no tratamento do CBNMI em relação ao P-MAPA. O adaptador MyD88 demonstrou papel essencial no compartilhamento das vias para produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons, sendo que sua ausência levou à ineficácia dos tratamentos com BCG e P-MAPA em todos os animais. A ação antitumoral do P-MAPA, bem como seu papel na restauração de p53 se mostraram dependentes da integridade do adaptador MyD88. Considerando os dados em conjunto, pode-se concluir que a ativação da via de sinalização para interferons pelo P-MAPA foi mais efetiva no tratamento do CBNMI em relação à sinalização de citocinas inflamatórias mediadas por BCG, de modo que o P-MAPA pode ser considerado uma importante alternativa terapêutica para esse tipo de tumor.

Abstract

Compounds that are able to act as Toll-like receptors (TLRs) agonists may represent promising candidates to be developed as drugs against cancer. Currently, the most effective therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) is immunotherapy with BCG (Bacillus Calmette-Guerin) associated with transurethral resection. However, the use of BCG is associated with side effects of varying strengths and in this scenario highlights the P-MAPA, which in great versatility and minimal cytotoxicity, opens a new perspective for fighting certain types of cancers, including NMIBC. Thus, the main objectives of this study were to characterize the histopathological and molecular effects of intravesical immunotherapy with P-MAPA involving the signaling pathways of TLRs 2 and TLR4 in the NMIBC treatment chemically induced in Wild Type mice (Wild Type - WT) and knockouts (-/-) for TLR4 and MyD88. The effects of P-MAPA immunotherapy were compared with BCG treatment. It were utilized 20 female mice of each strain (WT, TLR4 -/- and MyD88 -/-), all with 60 days of age and kept in the Nuclear Medicine Center, School of Medicine / USP - São Paulo. The animals were divided into 4 groups of 5 animals for each strain: Control Group (CTL): received intravesical dose of saline for 3 consecutive weeks; MNU Group: received a intravesical dose of N-methyl-N-Nitrosourea (MNU) every 15 days, a total of 3 doses; MNU+BCG Group: received received intravesical dose of BCG for 3 consecutive weeks; MNU+P-MAPA Group: received intravesical dose of P-MAPA for 3 consecutive weeks. After 09 weeks of experiment, urinary bladders were collected and submitted to histopathological and Western blotting analysis. The present study showed that P-MAPA immunotherapy led to distinct activation of the innate immune system TLR2 and 4-mediated when compared to BCG, resulting in increased signaling pathway for interferon (TRIF, IRF3, IFN- α and IFN- γ) and restoration of the p53 protein levels. The activation of the immune system by BCG resulted in increased signaling cytokines (IKK- α , IKK- β , NF κ -B and IL-6), which was not effective in the treatment of NMIBC when compared to P-MAPA. The MyD88 adapter was fundamental in the sharing of routes for the pro-inflammatory cytokines and interferons production, and its absence led to inefficacy of the treatments with BCG and P-MAPA in all animals. The antitumor action of P-MAPA, as well as its role in p53 restoration were dependent on the MyD88 adapter integrity. Taken together data obtained, it could be concluded that activation of interferons signaling pathway by P-MAPA was more effective in the NMIBC treatment in relation to the inflammatory cytokines signaling BCG-mediated, so that the P-MAPA immunotherapy could be considered an important therapeutic strategy for this tumor type.

1. Introdução

1.1. Carcinoma de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (Altekruse et al., 2010; American Cancer Society, 2015; Zhang et al., 2011; Siegel et al., 2012). A Sociedade Americana do Câncer estima que haverá cerca de 74 mil novos casos de CB diagnosticados e 16 mil mortes causadas pelo CB nos Estados Unidos em 2015 (American Cancer Society, 2015). Mais de 70% da incidência de CB é superficial (pTis, pTa e pT1), tumor não-invasivo (CBNMI), e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Kroft & Oyasu, 1994; Montironi & Lopez-Beltran, 2005; Reis et al., 2009; Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Zhang et al., 2011; Askeland et al., 2012). Já no Brasil, a estimativa segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é que em 2014 surgiram 8940 novos casos de CB (Instituto Nacional de Câncer, 2014). A idade média ao diagnóstico é de 65 a 70 anos e o pico de incidência ocorre aos 85 anos. (Schutzel et al., 2008; Kirkali et al., 2005) Com uma alta taxa de incidência, recorrência e progressão do CB, os gastos no tratamento dessa doença são bastante altos. Do diagnóstico até a morte o CB pode custar de 89287 a 202203 dólares por paciente, dependendo do país. (Botteman et al., 2003; Sievert et al., 2009) Por isso, por ser uma doença mais frequente em idosos, com o aumento da expectativa de vida da população a incidência da doença tende a ser maior, e esses gastos muito mais preocupantes para a saúde pública.

Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. O tabagismo é um dos maiores fatores de risco, o qual é responsável por um terço dos casos de CB (Zeegers et al., 2000). A fumaça do cigarro de tabaco contém cerca de 4.700 substâncias químicas, muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos *N-nitroso* e aminas aromáticas (Grimmer et al., 2000). A urina dos fumantes tem mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada com os compostos encontrados na urina de não-fumantes (Grimmer et al., 2000).

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos no período de algumas semanas de tratamento com doses baixas de carcinógenos químicos (Crallan et al., 2006; Reis et al., 2009) que são instilados diretamente na bexiga dos animais (Crallan et al., 2006). Em 1972, Hicks & Wakefield utilizaram 4 doses de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) para rápida indução do CBNMI em ratos, demonstrando que este é um carcinógeno completo. O

MNU pode atuar como iniciador e promotor da neoplasia podendo causar persistente metilação do DNA (Steinberg et al., 1990). Além disso, o MNU é o único carcinógeno conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica (Steinberg et al., 1990). Posteriormente, este modelo foi modificado e reproduziu tumores de bexiga que são clinicamente observados em humanos, os quais tiveram origem exclusiva no urotélio, foram espontâneos e não-implantados e histologicamente equivalentes ao carcinoma de células transicionais, sendo portanto, um importante modelo para o estudo do CBNMI (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2010).

O estudo do CBNMI tem sido amplamente abordado utilizando-se diversos modelos experimentais, dentre eles, modelos de linhagens celulares uroteliais provenientes de roedores que são facilitados pela acessibilidade do tecido e pela pronta transformação espontânea destas células comparadas às humanas. No entanto, a relevância clínica dos achados derivados destes modelos necessita de validação em modelos *in vivo* (Bohle & Brandau, 2003; Crallan et al., 2006). Os modelos animais para carcinogênese de bexiga apresentam características semelhantes ao CBNMI desenvolvido em humanos (Reis et al., 2009). A estrutura e função do trato urinário inferior de roedores são semelhantes a dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CBNMI, sugerindo que os roedores servem como modelo experimental para o CB (Williams et al., 2008).

A carcinogênese urotelial em roedores sofre uma sequência de alterações morfológicas, iniciando com hiperplasia simples seguida de hiperplasia nodular e papilar (Oliveira et al., 2006), progredindo posteriormente para papiloma e, ocasionalmente, carcinomas não-invasivos e, finalmente, a neoplasias invasivas (Oyasu, 1995; Cohen, 2002). Muitos tumores exofíticos induzidos em ratos são polipóides, geralmente pedunculados e com um padrão de crescimento papilar invertido (Oyasu, 1995; Cohen, 2002). A hiperplasia nodular em camundongos é consideravelmente mais comum do que as proliferações papilíferas, ocorrendo com certa frequência com ausência completa de hiperplasia papilar (Fukushima et al., 1981).

1.2 – Via de Sinalização dos Receptores *Toll Like* (TLR), NF- κ B e p53

Os receptores de *toll-like* (TLRs) pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares conservados de origem microbiana que são conhecidos por padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) (Srikrishna & Freeze, 2009; Galli et al., 2010; Kumar et al., 2011). Também, os TLRs têm um papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). Neste contexto, os ligantes de TLRs podem ser derivados

microbianos ou hospedeiros endógenos (Takeda et al., 2003; Galli et al., 2010). TLRs que reconhecem lipídios e proteínas ligantes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) estão expressos na membrana plasmática, enquanto TLRs que detectam ácidos nucleicos virais (TLR3, TLR7 e TLR9) estão localizados em compartimentos lisossomais (Takeda et al., 2003; Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Galli et al., 2010).

A sinalização dos TLRs induz a ativação dos genes de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs), proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs) e os fatores regulatórios de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF- κ B e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF- α e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Galli et al., 2010). A função clássica dos TLRs consiste no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados com posterior indução de respostas imunes adaptativas (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010). A ativação de TLRs na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM), as quais desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (Galli et al., 2010).

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras que possuem domínios TIR em sua estrutura para interagir com o domínio TIR intracelular dos TLRs (**Figura 1**) (Takeda & Akira, 2004). As moléculas adaptadoras envolvidas na sinalização dos receptores TLRs são: fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), TIRAP, TRIF e TRAM (**Figura 1**) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção do TLR3, e ativa NF- κ B e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas inflamatórias (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TLR3 utiliza a molécula adaptadora TRIF para sinalizar a produção de interferon e citocinas inflamatórias via ativação dos fatores de transcrição, IRF3 e NF- κ B, respectivamente (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TRAM e TIRAP são moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e pelo TLRs 2 e 4 para recrutar MyD88, respectivamente (**Figura**

1) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). Assim, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas: via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de citocinas inflamatórias e via dependente de TRIF (via não-canônica) para a produção de interferon (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004). TLR4 é o único receptor que utiliza as quatro moléculas adaptadoras (MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM) para desencadear sua sinalização (**Figura 1**) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004).

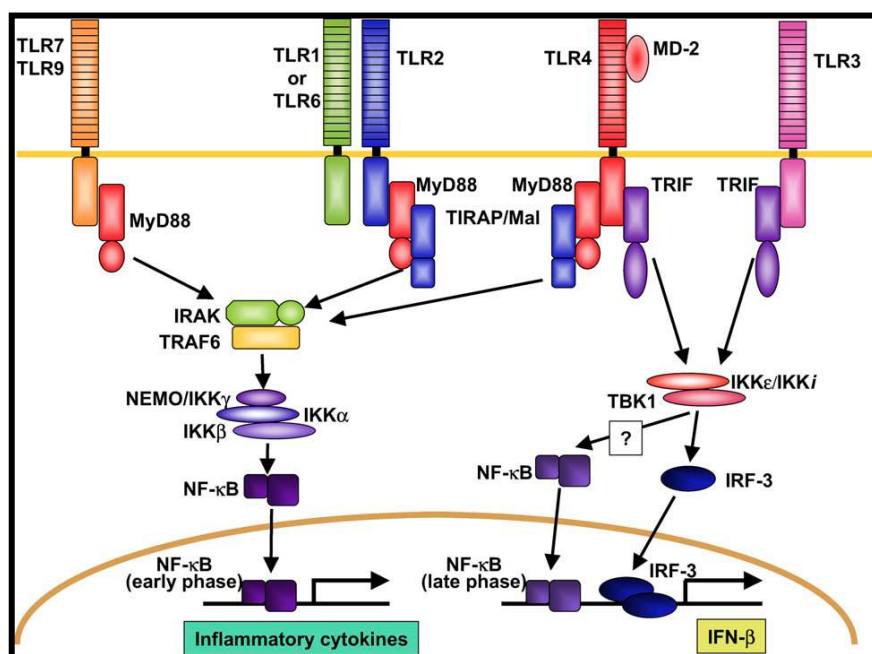


Figura 1: Via de sinalização dos TLRs (Takeda & Akira, 2004)

Os TLRs foram, inicialmente, identificados somente em células imunes e epiteliais, contudo estudos recentes demonstraram que estes receptores também são expressos em algumas células tumorais, sendo que essa expressão está relacionada à carcinogênese (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Galli et al., 2010). O papel dos TLRs no câncer é uma questão controversa, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese. A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos antineoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos e humanos (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). A ativação dos TLR pode causar a regressão do tumor através do aumento da permeabilidade vascular e por meio do recrutamento de leucócitos, os quais determinam a lise das células tumorais pelas células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). Assim, um dos efeitos mais promissores da estimulação dos TLRs por

agonistas específicos na terapia do câncer é a ativação do sistema imune adaptativo (Krieg, 2007; Paone et al, 2008; Galli et al., 2010).

Evidências contraditórias apontam que sob certas condições, a inflamação promove carcinogênese, enquanto em outras ela exerce efeitos antitumorais. Este fato pode ser explicado pela diferença de intensidade e da natureza da resposta inflamatória (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Na maioria dos casos, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores que estimulam o reparo tecidual e a proliferação e sobrevivência da célula cancerosa (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). No entanto, se a resposta inflamatória se desenvolve em inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado com consequente regressão do tumor (Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010). Considerando os diversos elementos que controlam os processos neoplásicos, um importante papel é atribuído aos membros da superfamília de quimiocinas (Ben-Baruch, 2006). Quimiocinas expressas pelas células tumorais e células do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tumor através da regulação da migração de diferentes subtipos de leucócitos (Ben-Baruch, 2006). A proporção relativa de cada tipo de célula de defesa no interior do tumor, por exemplo, macrófagos, células T, células NK, células dendríticas, ou outros subtipos de leucócito, determina em grande parte o perfil imunológico local (Allavena et al., 2008). Em particular, células T CD8 e alguns tipos de células do sistema imunológico inato, como as células NK, podem inibir o crescimento tumoral (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008; Galli et al., 2010).

Em contraste, a estimulação de alguns TLRs demonstrou aumento na proliferação e sobrevivência tumoral, sugerindo que a estimulação dos TLRs favorece a carcinogênese (Jego et al., 2006). Recentemente, a expressão aberrante do TLR4 foi encontrada na maioria dos carcinomas humanos, incluindo o CB (Huang et al, 2005; Brown et al., 2003). Ainda, estudos têm demonstrado que a ativação da sinalização do TLR4 em células cancerosas correlacionou-se com a progressão do tumor (Huang et al., 2005). Um estudo recente demonstrou que as células uroteliais da bexiga urinária expressaram TLR4 e a ativação da sinalização do TLR4 resultou em uma resposta significativa de IL-6 (Song et al., 2007). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com funções pró-inflamatórias em células imunes e não imunes (Seguchi et al., 1992). Cardillo et al. (2000) demonstraram níveis elevados de IL-6 no soro e urina de pacientes com CB. Já Okamoto et al. (1997) verificaram que a IL-6 promoveu o crescimento *in vitro* das células do CB. Esses mesmos autores concluíram que a IL-6 associada ao tumor pode atuar como um fator de crescimento autócrino para o CB. Entretanto, os mecanismos moleculares indutores de resposta da IL-6 nas células do CB ainda não foram elucidados.

A via de sinalização do NF- κ B desempenha um papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse (Pahl, 1999; Meng et al., 2010). NF- κ B é um fator de transcrição encontrado no citoplasma ligado aos chamados inibidores de NF- κ B (I κ B). A ativação do NF- κ B por fatores de crescimento e inflamatórios é mediada através das proteínas quinases I κ B (IKKS), que fosforilam I κ B, resultando na ubiquitinação I κ B α e subsequente degradação proteossômica (**Figura 1**) (Pahl, 1999; Pikarsky et al., 2004; Meng et al., 2010). Como consequência, o NF- κ B é liberado do complexo I κ B e se transloca para o núcleo, onde se liga em sítios consenso do DNA, ativando a expressão gênica (Pahl, 1999; Pikarsky et al., 2004). A ampla distribuição dos sítios de ligação do NF- κ B no genoma permite regular um vasto número de genes e participar em processos celulares fundamentais, tais como apoptose, proliferação e diferenciação (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005). O NF- κ B responde a várias moléculas, como IL-1, TNF- α , citocromo P450, melatonina e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005).

p53 é uma proteína citoplasmática codificada pelo gene TP53 (localizado no braço curto do cromossomo 17) (Lu et al., 2002; Shariat et al., 2009; Netto, 2011). Esta proteína é de fundamental importância, pois é responsável por regular o ciclo celular, além de ser supressora tumoral (Lu et al., 2002; Shariat et al., 2009; Netto, 2011). Estudos de sequências promotoras de resposta ao gene TP53 sugerem um papel geral desse como regulador dos danos ao DNA e no controle da expressão gênica dos TLRs (Menendez et al., 2011). A maioria dos genes TLR responde ao p53 por via canônica, bem como pelos sítios promotores de ligação não-canônicos (Menendez et al., 2011). p53 possui diversos mecanismos antitumorais, tais como: ativação de proteínas de reparo do DNA, quando este encontra-se mutado; induzir a apoptose se o dano ao DNA for irreparável; controle do crescimento celular quando há dano ao DNA, interrompendo o ciclo celular na fase G1/S; e inibição de angiogênese (Lu et al., 2002; Shariat et al., 2009; Netto, 2011). Diferentes trabalhos demonstraram que mutações no gene TP53, com conseqüente acúmulo da proteína p53 nos núcleos das células tumorais uroteliais, estão relacionadas à uma maior taxa de recorrência da neoplasia e diminuição da sobrevida dos pacientes acometidos por esse tipo de câncer (Lu et al., 2002; Shariat et al., 2009; Netto, 2011).

1.3 – Imunoterapias no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo

O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral (RTU), seguido da imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), para diminuição da recidiva e prevenção da progressão tumoral (Askeland et al., 2012). O câncer vesical, caracterizado por lesões superficiais (CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva

e progressão após ressecção endoscópica (Askeland et al., 2012). Os tumores superficiais são classificados em 3 estágios: Tis - carcinoma *in situ*; Ta - papilífero e T1 - tumor confinado a mucosa e submucosa da bexiga, ocorrendo em 10%, 70% e 20%, respectivamente (Ro et al., 1992; Epstein et al., 1998). Contudo, 20% - 30% desses tumores apresentam progressão e 70% recorrência pós-tratamento exclusivo com RTU (Kemp et al., 2005; Askeland et al., 2012). Por outro lado, sabe-se que a terapia adjuvante com BCG diminuiu esses índices para 30% (Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012). Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada atualmente a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas & Brandau, 2003; Hall et al., 2007; Askeland et al., 2012).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical. Citocinas como TNF- α , fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN) e ILs induzem resposta de linfócitos T-helper e das células NK na bexiga (Andreas & Brandau, 2003). De acordo com Schamhart et al. (2000), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de 1 ano. Contudo, tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (Schamhart et al., 2000). O uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (Lamm et al., 1986; Sylvester et al., 2002; Bohle & Brandau, 2003).

Dessa forma, tratamentos alternativos utilizando imunomoduladores, como o uso do agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA) têm sido propostos com resultados promissores (Perabo et al., 2005; Durán & Nunes, 1990; Nunes & Durán, 2003). O P-MAPA é um biopolímero não-linear, com massa molecular de 320 kDa, produzido por método biotecnológico utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* (Nunes & Durán, 2003). Os principais componentes da molécula são Mg^{2+} , NH_4^+ , fosfato, ácidos linoleico e palmitoleico e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da

seguinte maneira: Asp 7,19%; Thr 3,56%; Ser 7,56%; Glu 8,53%; Pro 0,5%; Gly 9,69%; Ala 7,46%; Val 1,0%; Met 4,38%; Isoleu 2,54%; Leu 3,03%; Tyr 0,5%; Phe 1,0%; His 2,83%; Lys 3,56%; Trp 1,3% e Arg 35,2% (Nunes & Durán, 2003). O P-MAPA é um fármaco cristalino, cujo diâmetro médio dos cristais é de aproximadamente 200 µm (**Figura 2**).

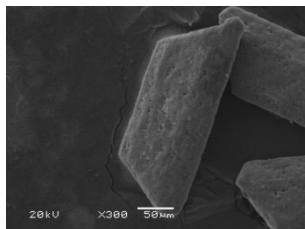


Figura 2: Micrografia dos microcristais de P-MAPA

O P-MAPA não demonstrou citotoxicidade ou genotoxicidade em culturas de células V79 e linfócitos humanos, bem como se mostrou atóxico em camundongos, cães e macacos (Durán et al., 1993). Estudos preliminares *in vivo* e *in vitro* indicaram que este imunomodulador mostrou-se capaz de combater doenças infecciosas, virais e alguns tipos de cânceres (Durán et al., 1997; Justo et al., 1999). Justo et al. (2003) verificaram, em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), mielossupressão, aumento do número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófagos (CFU-GM) no baço e esplenomegalia. Após tratamento subcutâneo de P-MAPA durante 7 dias nestes animais, observou-se redução de 35% da esplenomegalia e do crescimento tumoral, estimulação da mielopoiese, além do aumento da produção de IL-2 e interferon-gama (IFN- γ) com consequente aumento da atividade de células NK (Justo et al., 2003). De acordo com estes autores, o efeito modulador do P-MAPA na resposta mielopoietica está relacionado à sua atividade antitumoral como um possível mecanismo de regulação na produção de CFU-GM e expressão de suas atividades funcionais. Também, Melo et al. (2001) avaliaram os efeitos do P-MAPA no número de CFU-GM na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e concluíram que este imunomodulador potencializou os mecanismos imunológicos reguladores das células precursoras da medula óssea, as quais estão envolvidas no controle das alterações provocadas pelo tumor no sistema hemolinfopoiético do hospedeiro. Também, Santiago et al. (2013) investigaram o potencial imunoterapêutico do P-MAPA na leishmaniose visceral em cães e verificaram que o P-MAPA promoveu melhora dos sinais clínicos e significativa redução da carga parasitária na pele desses animais. Esses mesmos autores, verificaram que em culturas de células mononucleares do sangue periférico houve diminuição dos níveis de IL-10 e aumento dos níveis de IL-2 e IFN- γ .

Em modelos animais para o estudo de câncer, o P-MAPA demonstrou capacidade de reverter o estado de imunossupressão causado pelo processo tumoral, estando associado a este efeito um significativo impacto terapêutico na doença primária ou nos processos metastáticos (Justo et al., 2003). Estudos do presente grupo de pesquisa demonstraram que o P-MAPA possui um importante efeito antitumoral no CBNMI. O P-MAPA aumentou os níveis protéicos de TLR2, TLR4 e p53 quando administrado intravesicalmente em animais com CBNMI induzido quimicamente, correlacionando com a regressão tumoral (Fávaro et al., 2012). Também, experimentos *in vitro* com células HEK293 relevaram que o tratamento dessas células com P-MAPA ativou o NF- κ B com consequente estimulação dos TLRs 2 e 4 (Fávaro et al., 2012). Assim concluiu-se que o P-MAPA atuou como agonista dos TLRs 2 e 4 e ativou p53, melhorando o estado imunológico no CBNMI (Fávaro et al., 2012).

Além disso, outros componentes do P-MAPA como a arginina e seus metabólitos, parecem modular o crescimento de vários tipos de células cancerosas. Singh et al. (2002) verificaram que este aminoácido é responsável por causar citostase e apoptose de células cancerosas.

A imunoterapia com BCG é a forma mais eficaz de terapia intravesical para a profilaxia da recorrência e progressão do 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, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do câncer, incluindo o CBNMI.

Em face do papel estratégico dos imunoterápicos e dos avanços dos métodos biotecnológicos para produção de novas moléculas com atividade farmacológica, destaca-se o imunomodulador P-MAPA, que por sua grande versatilidade e mínima citotoxicidade, reveladas através de estudos *in vivo* e *in vitro*, abre uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o CBNMI. Os estudos iniciais do nosso grupo demonstraram que no tratamento *in vivo* do CBNMI com P-MAPA houve regressão significativa do tumor, indicando um importante efeito antitumoral deste imunomodulador envolvendo a ativação dos TLRs 2 e 4 (Favaro et al., 2012).

Outro ponto relevante, é o estudo da interação das diferentes modalidades terapêuticas com os mecanismos de reparo celular envolvendo as vias de sinalização dos TLRs 2 e 4, p53, NF-κB, PI3K, PTEN e Akt, as quais são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial. Atualmente as terapias antitumorais consistem no ataque de células em divisão através de quimioterapia e radioterapia. O sucesso do tratamento depende do tipo de câncer, uma vez que cada neoplasia apresenta características particulares de sobrevivência e evasão imune. O estudo da biologia das células cancerosas demonstrou um persistente ambiente imunossupressor ao redor das células transformadas (Liu et al., 2007). Assim, compostos que são capazes de agir como agonistas dos receptores *Toll-like* (TLRs) podem representar candidatos promissores a serem desenvolvidos como medicamentos contra o câncer. Contudo, os mecanismos de ativação do sistema imune através das vias de sinalização dos TLRs pelo P-MAPA necessitam de elucidação.

A descoberta e desenvolvimento de medicamentos, como o P-MAPA, é um empreendimento de alto risco e de longo prazo de maturação que exige a participação de muitos grupos e instituições de pesquisa para ser bem sucedido. Este processo pode ser auxiliado ou facilitado, pela eventual existência de um ambiente social e econômico que seja estimulador da criação de produtos de base tecnológica, retribuindo a novidade ou utilidade criada. A parceria do nosso grupo de pesquisa com a Farmabrilis, uma organização não governamental sem finalidades lucrativas e uma rede internacional de pesquisas, objetiva construir um ambiente de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos pioneiro e único na América do Sul. Assim, nossa contribuição para o desenvolvimento do P-MAPA foi identificar os possíveis mecanismos de ação e seus efeitos biológicos no tratamento do câncer de bexiga urinária.

Considerando a importância de tratamentos alternativos que reduzam as taxas de recorrência, progressão tumoral, bem como seu impacto na evolução clínica dos pacientes com CBNMI, os objetivos gerais deste estudo foram caracterizar os efeitos histopatológicos e moleculares das imunoterapia intravesical com P-MAPA envolvendo as vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 no tratamento do CBNMI induzido em camundongos selvagens (*wild type* - WT) e *knockouts* (KO) para TLR4 e MyD88, bem como estabelecer os possíveis mecanismos de ação desse imunomodulador relacionando as vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 com os outros fatores de reparo celular (NF-κB, p53). Os efeitos da imunoterapia com P-MAPA foram comparados com o tratamento com BCG. Tais objetivos gerais foram alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

a) Caracterização da histopatologia do CBNMI de camundongos *WT*, *TLR4*^{-/-} e *MyD88*^{-/-} induzidos quimicamente, e comparar a progressão tumoral frente às imunoterapias com BCG e P-MAPA;

b) Caracterizar e comparar os efeitos das imunoterapias com BCG e P-MAPA nas vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 (*IKK- α* , *IKK- β* , *NF- κ B*, *IL-6*, *TRIF*, *IRF3*, *IFN- α* , *IFN- γ*) por *Western Blotting* no CBNMI de camundongos *WT*, *TLR4*^{-/-} e *MyD88*^{-/-} induzidos quimicamente;

2. Materiais e Métodos

2.1 – Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (*wild type* - WT), 20 camundongos fêmeas *knockout* para TLR4 (TLR4^{-/-}) e 20 camundongos fêmeas *knockout* para MyD88 (MyD88^{-/-}), todos com 60 dias de idade e mantidos no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina/ Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo. Para a indução do CBNMI, 45 animais (sendo 15 animais de cada linhagem) foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 0,1 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semanas 0, 2, 4), totalizando 3 doses (modificado de Fávaro et al., 2012). Os outros 15 animais (sendo 5 animais de cada linhagem) que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle**. Posteriormente, os animais foram divididos em 4 grupos (5 animais por grupo) para cada linhagem:

- a) **Grupo Controle:** recebeu uma dose intravesical de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 3 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012);
- b) **Grupo MNU (Câncer):** recebeu o mesmo tratamento que o grupo Controle;
- c) **Grupo MNU+BCG:** recebeu uma dose intravesical de 10⁶ UFC – 40 mg de BCG (Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil) diluída em 0,1 mL de solução fisiológica 0,9% por 3 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012);
- d) **Grupo MNU+P-MAPA:** recebeu uma dose intravesical de 5 mg/Kg de P-MAPA (Farmabrilis, São Paulo, Brasil) dissolvida em 0,1 mL de solução fisiológica 0,9% por 3 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012).

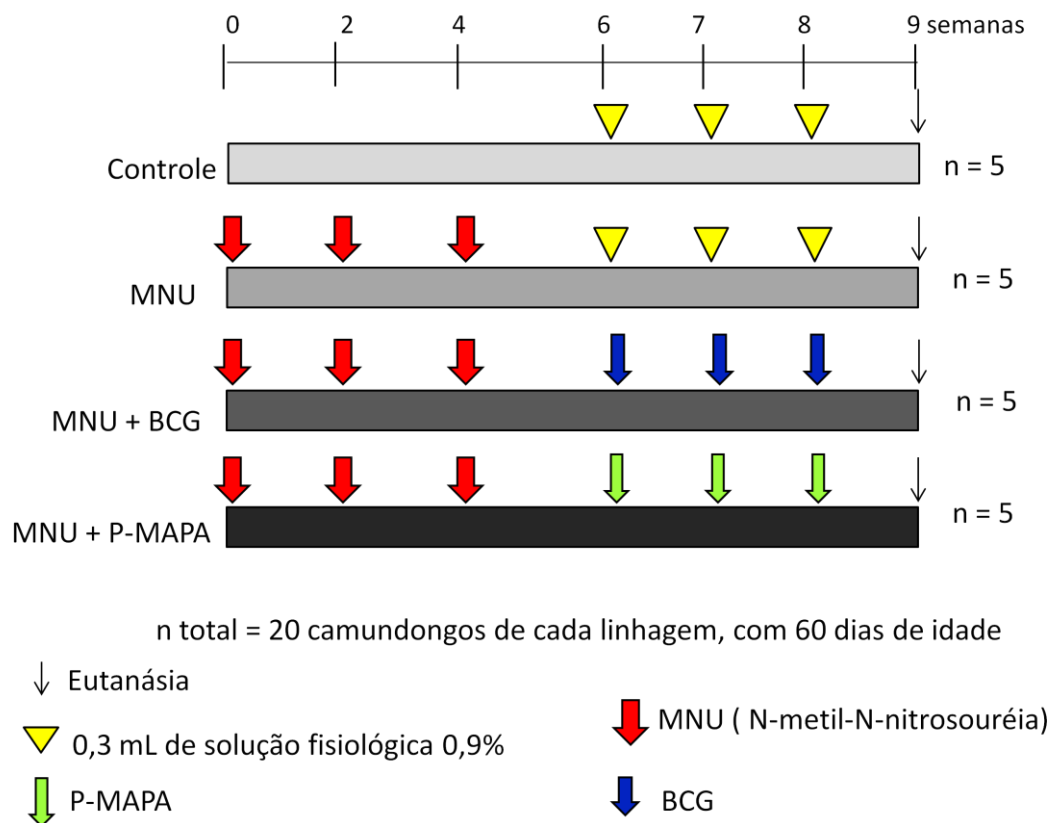


Figura 3: Delineamento Experimental.

As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (Abocath, São Paulo, Brasil). Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Após 9 semanas de experimento, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas e *Western Blotting*.

2.2 – Análises Histopatológicas

Amostras da bexiga urinária de 5 animais de cada grupo experimental (para cada linhagem: WT, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}) foram coletadas, fixadas em Bouin por vinte e quatro horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois, diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em *Paraplast Plus* (Sigma, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e fotografados em fotomicroscópio. As lesões uroteliais foram classificadas conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein et al., 1998).

2.3 – Extração de Proteínas e Western Blotting

Amostras da bexiga urinária foram coletadas de todos os animais de cada grupo experimental, congeladas e, posteriormente, submetidas as análises de *Western Blotting*. Os fragmentos foram homogeneizados em tampão de extração, e os extratos obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford e as leituras feitas por ELISA (*Multi-Mode Microplate Reader Synergy H1M; Bio-Tek Instruments, EUA*). O correspondente a 70 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários específicos para a detecção dos antígenos TLR2, TLR4, NFκB, IL-6, TRIF, IRF3, IFN-γ, IFN-α, IKK-α, IKK-β e p53 diluídos em BSA 1% (**Tabela 1**). Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários (Anti-Rabbit IgG, A6154, *Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA*; Anti-Mouse IgG, A2304, *Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA*; Anti-Goat IgG, AP106P, *Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha*) diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O anticorpo para Actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *NIHImageJ 1.47v* (*National Institute of Health, EUA. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>*).

Tabela 1: Características dos Anticorpos Primários para *Western Blotting*.

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Código	Fonte
TLR2	Rabbit (Policlonal)	251110	<i>Abbiotec, San Diego, CA, EUA</i>
NFκB	Rabbit (Policlonal)	ab7970	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
IL-6	Rabbit (Policlonal)	251287	<i>Abbiotec, San Diego, CA, EUA</i>
TRIF	Rabbit (Policlonal)	ab13810	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
IRF3	Rabbit (Policlonal)	ab25950	<i>Abcam, Cambridge, MA, EUA</i>
IFN-γ	Mouse (Policlonal)	507802	<i>BioLegend, San Diego, CA, EUA</i>
IFN-α	Rabbit (Policlonal)	Mbs857227	<i>MyBioSource, Inc., San Diego, CA, EUA</i>
TLR4	Rabbit (Policlonal)	sc-30002	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>
IKK-α	Rabbit (Policlonal)	sc-7218	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>
IKK-β	Goat (Policlonal)	sc-34673	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>
P53	Rabbit (Policlonal)	sc-6243	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>
Actin	Goat (Policlonal)	sc-1615	<i>Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA</i>

2.4 - Análises Estatísticas

Os parâmetros quantificados (análises de *Western Blotting*) foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey post hoc para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 1% e 5%. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3. Resultados

3.1 Análises Histopatológicas

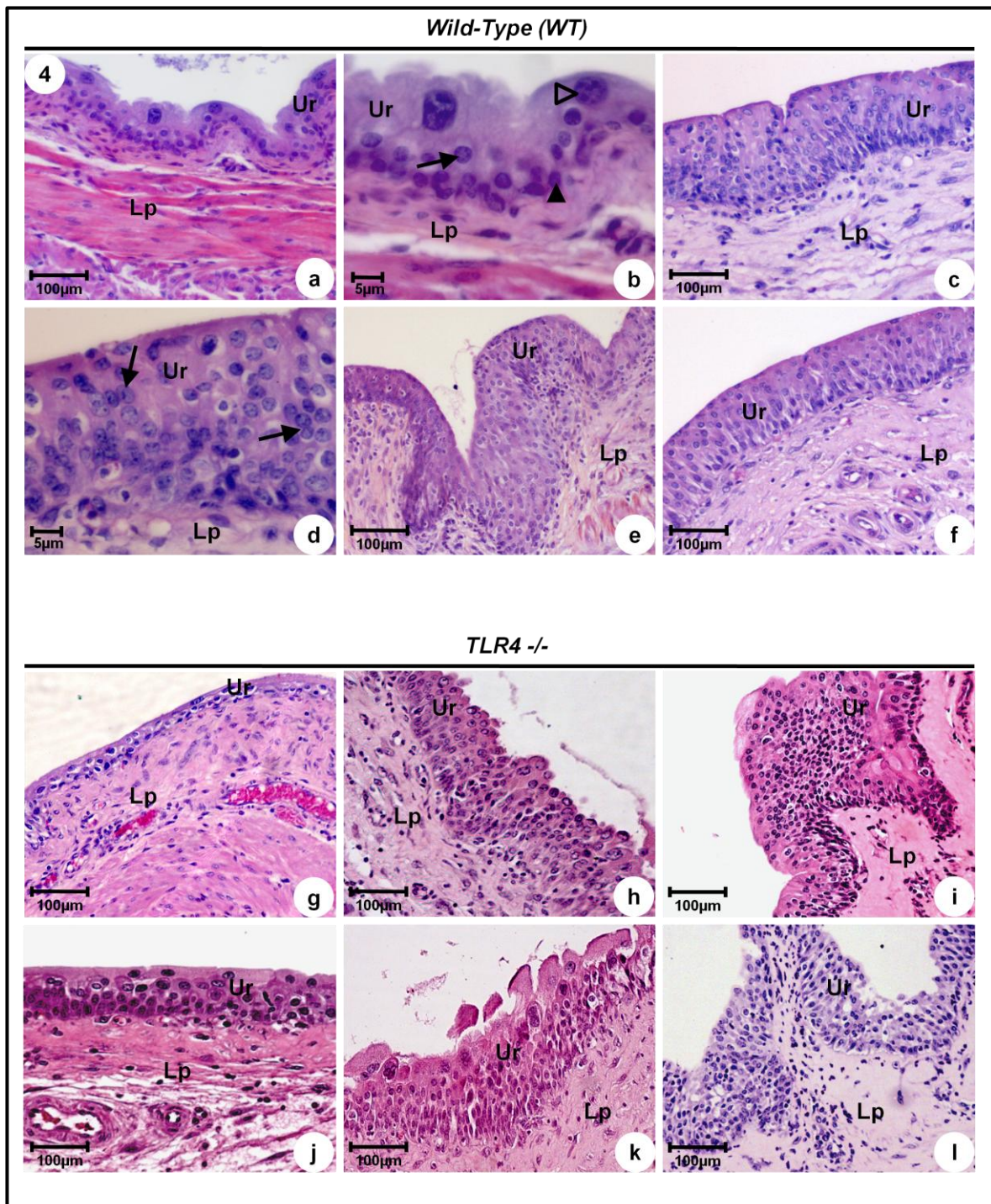
3.1.1 Animais *Wild Type*

O grupo Controle não apresentou alterações histopatológicas. O urotélio normal foi composto por 2 - 3 camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (Figuras 4a, 4b; Tabela 2).

Em contraste, o trato urinário do grupo MNU apresentou alterações histopatológicas, tais como: carcinoma *in situ* (pTis) (Figura 4c, 4d) e carcinoma papilífero (pTa) em 80% e 20% dos animais, respectivamente (Tabela 2). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes. O carcinoma papilífero (pTa) foi caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos.

O carcinoma papilífero de alto grau (40%) (Figura 4e) e o Carcinoma *in situ* (40%) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo MNU+BCG. Apenas 20% não apresentou nenhuma alteração histopatológica, sendo considerado normal (Tabela 2).

Nas análises histopatológicas do grupo MNU+P-MAPA, foi mais frequente o urotélio normal, presente em 60% dos animais (Tabela 2). A única alteração histopatológica encontrada no grupo MNU+P-MAPA foi hiperplasia plana (40%) (Figura 4f). A hiperplasia plana foi caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas.



Figuras 4a – 4f: Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias da linhagem *wild-type* (WT) TLR4^{-/-} dos grupos Controle (a, b), MNU (c, d), MNU+BCG (e) e MNU+P-MAPA (f). (a, b) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada superficial composta por células em guarda-chuva (**cabeça de seta aberta**), uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**) e uma camada de células intermediárias (**seta**). (c, d) Carcinoma *in situ* (pTis) caracterizado por intensa atipia celular e núcleos volumosos (**setas**). (e) Carcinoma papilífero (pTa) alto grau caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade. (f) Hiperplasia plana caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas. a - f: **Lp** – lâmina própria, **Ur** - urotélio.

Figuras 4g – 4l: Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias da linhagem TLR4-/- dos grupos Controle (g), MNU (h), MNU+BCG (i) e MNU+P-MAPA (j, k, l). (g, j) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células em guarda-chuva, uma camada de células basais e uma camada de células intermediárias. (h) Carcinoma *in situ* (pTis) caracterizado por intensa atipia celular e núcleos volumosos. (i) Carcinoma papilífero (pTa) alto grau caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade. (k) Hiperplasia plana caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas. (l) Neoplasia intraurotelial de baixo grau caracterizada (displasia) caracterizada por espessamento do urotélio e presença de poucas atipias celulares. g - l: **Lp** – lâmina própria, **Ur** - urotélio.

Tabela 2: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais *Wild Type* dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA.

Histopatologia	Grupos			
	Controle (n= 05)	MNU (n= 05)	MNU+BCG (n= 05)	MNU+P-MAPA (n= 05)
Normal	05 (100%)	-	01 (20%)	03 (60%)
Hiperplasia Plana	-	-	-	02(40%)
Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	04 (80%)	02 (40%)	-
Carcinoma Papilífero de Alto Grau (pTa)	-	01 (20%)	02 (40%)	-

3.1.2 Animais TLR4-/-

O grupo Controle não apresentou alterações histopatológicas. O urotélio normal foi composto por 2 - 3 camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (Figura 4g).

Em contraste, o trato urinário do grupo MNU apresentou alterações histopatológicas, tais como: carcinoma *in situ* (pTis) (Figura 4h), e carcinoma papilífero (pTa) em 60% e 40% dos animais, respectivamente (Tabela 3). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes. O carcinoma papilífero (pTa) foi caracterizado por extensas

lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos.

O carcinoma papilífero de Alto Grau (80%, Figuras 4i) e o Carcinoma *in situ* (20%) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo MNU+BCG (Tabela 3).

No grupo MNU+P-MAPA, apenas 40% dos animais não apresentou nenhuma alteração histopatológica, sendo semelhante ao grupo Controle (Figura 4j). As alterações histopatológicas mais frequentes foram Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau (20%, Figura 4l), Hiperplasia Plana (20%, Figura 4k) e Carcinoma Papilífero (20%, Tabela 3) . A neoplasia intraurotelial de baixo grau foi caracterizada por aumento do número de camadas celulares no urotélio, hipercromasia nuclear e displasia, a hiperplasia plana foi caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas e o carcinoma papilífero (pTa) foi caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos.

Tabela 3: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais TLR4-/- dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA.

Histopatologia	Grupos			
	Controle (n= 05)	MNU (n= 05)	MNU+BCG (n= 05)	MNU+P-MAPA (n= 05)
Normal	05 (100%)	-	-	02 (40%)
Hiperplasia Plana	-	-	-	01 (20%)
Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau	-	-	-	01 (20%)
Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	03 (60%)	01 (20%)	-
Carcinoma Papilífero (pTa)	-	02 (40%)	04 (80%)	01 (20%)

3.1.3 Animais MyD88-/-

O grupo Controle não apresentou alterações histopatológicas. O urotélio normal foi composto por 2 - 3 camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular

intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (Figura 5a, 5b).

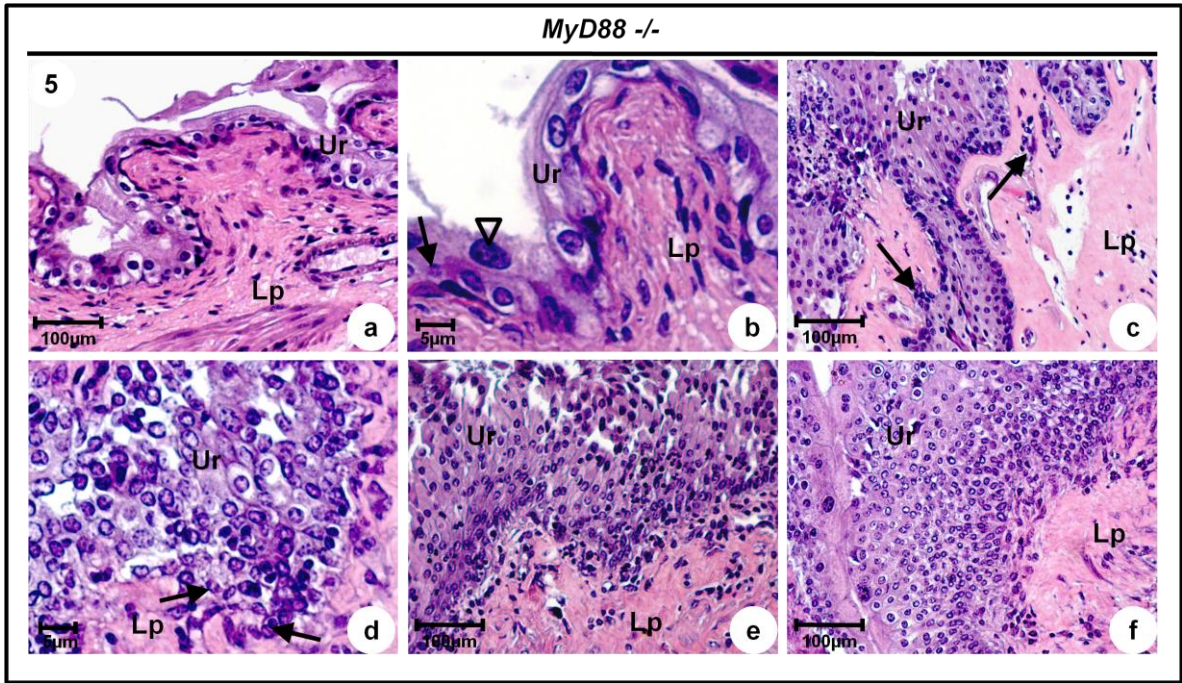
Em contraste, o trato urinário do grupo MNU apresentou alterações histopatológicas, tais como: carcinoma *in situ* (pTis) em 20% dos animais, carcinoma papilífero de alto grau (pTa) em 20% dos animais e 60% dos animais apresentou Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1) (Figuras 5c, 5d, Tabela 4). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes. O carcinoma papilífero de alto grau (pTa) foi caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos. 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.

O carcinoma urotelial com invasão de lâmina própria (60%), o carcinoma papilífero de alto grau (20%, Figura 5e) e o Carcinoma *in situ* (20%) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo MNU+BCG (Tabela 4).

No grupo MNU+P-MAPA, 80% dos animais apresentaram Carcinoma Papilífero de Alto Grau (pTa) (Figura 5f) e 20% apresentou Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1) (Figuras 3f, Tabela 3). Além disso, 20% dos animais apresentou metaplasia escamosa caracterizada por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear.

Tabela 4: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais MyD88-/- dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA.

Histopatologia	Grupos			
	Controle (n= 05)	MNU (n= 05)	MNU+BCG (n= 05)	MNU+P-MAPA (n= 05)
Normal	05 (100%)	-	-	-
Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	01 (20%)	01 (20%)	-
Carcinoma Papilífero de Alto Grau (pTa)	-	01 (20%)	02 (40%)	04 (80%)
Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1)	-	03 (60%)	02 (40%)	01 (20%)



Figuras 5a – 5f: Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias da linhagem MyD88-/- dos grupos Controle (a, b), MNU (c, d), MNU+BCG (e) e MNU+P-MAPA (f). (a, b) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada superficial composta por células em guarda-chuva (**cabeça de seta aberta**), uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**) e uma camada de células intermediárias (**seta**). (c, d) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**setas**) invadindo a lâmina própria. (e, f) Carcinoma papilífero (pTa) alto grau

caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade. a - f: **Lp** – lâmina própria, **Ur** - urotélio.

3.2 Análises de Western Blotting

3.2.1 Animais Wild Type

Via dependente de MyD88 (canônica)

Os níveis protéicos para TLR2 foram significativamente maiores nos grupos MNU+BCG e MNU+P-MAPA, em relação aos grupos Controle e MNU. Em relação a IKK- α , o grupo MNU+P-MAPA apresentou seus níveis protéicos próximos aos níveis protéicos do grupo Controle, enquanto que o grupo MNU apresentou o nível mais baixo de IKK- α e o grupo MNU+BCG apresentou o nível mais alto. Já para IKK- β , os níveis protéicos mais altos foram no grupo MNU+BCG em relação aos níveis mais baixos dos grupos Controle, MNU e MNU+P-MAPA (Figura 6).

Para IL-6, os níveis protéicos foram significativamente mais baixos nos grupos MNU+P-MAPA e Controle em relação aos grupos MNU e MNU+BCG. Para NF κ B, os níveis protéicos também foram significativamente mais baixos nos grupos MNU+P-MAPA e Controle em relação aos grupos MNU e MNU+BCG (Figura 7).

Via dependente de TRIF (não canônica)

Para TLR4, os níveis protéicos foram significativamente mais altos no grupo MNU+P-MAPA em relação aos grupos Controle, MNU e MNU+BCG. Já para TRIF os níveis protéicos foram significativamente mais altos nos grupos MNU+P-MAPA, seguido pelo grupo Controle, em relação aos grupos MNU e MNU+BCG. Em relação ao IRF3, os níveis protéicos também foram significativamente mais altos no grupo MNU+P-MAPA, seguido pelo grupo Controle, quando comparados com os grupos MNU e MNU+BCG (Figura 8).

Para IFN- α , os níveis protéicos foram significativamente mais altos no grupo MNU+P-MAPA seguido pelos grupos Controle, MNU+BCG e MNU. Já para IFN- γ , o nível protéico apresentou-se significativamente mais alto no grupo MNU+P-MAPA seguidos pelos grupos MNU+BCG, MNU e Controle (Figura 9).

Para p53, os níveis protéicos foram significantemente mais altos nos grupos MNU+P-MAPA e Controle e os grupos MNU e MNU+BCG apresentaram níveis protéicos mais baixos de P53 (Figura 9).

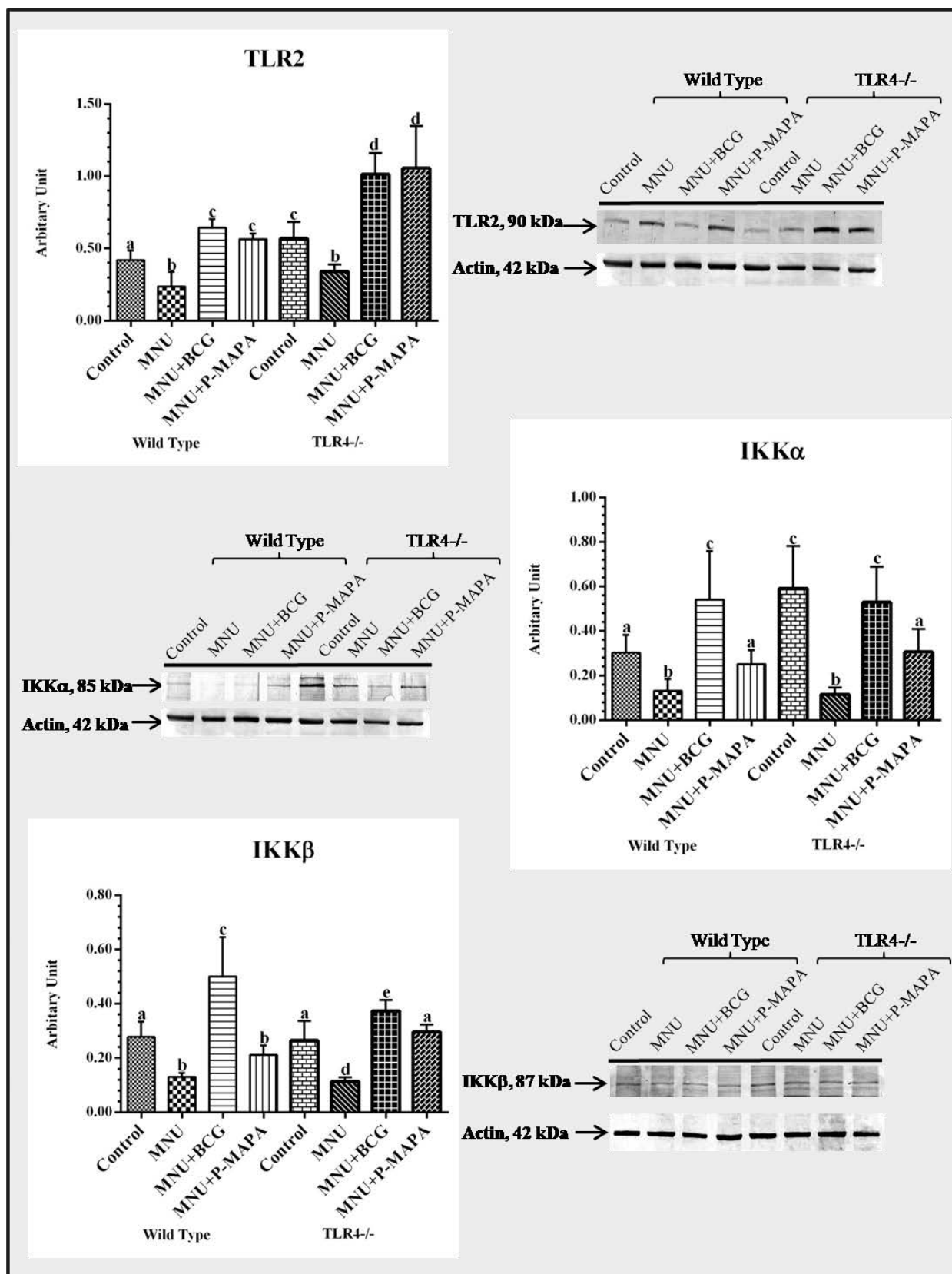


Figura 6: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas TLR2, IKK- α e IKK- β extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e TLR4^{-/-}. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 05$)

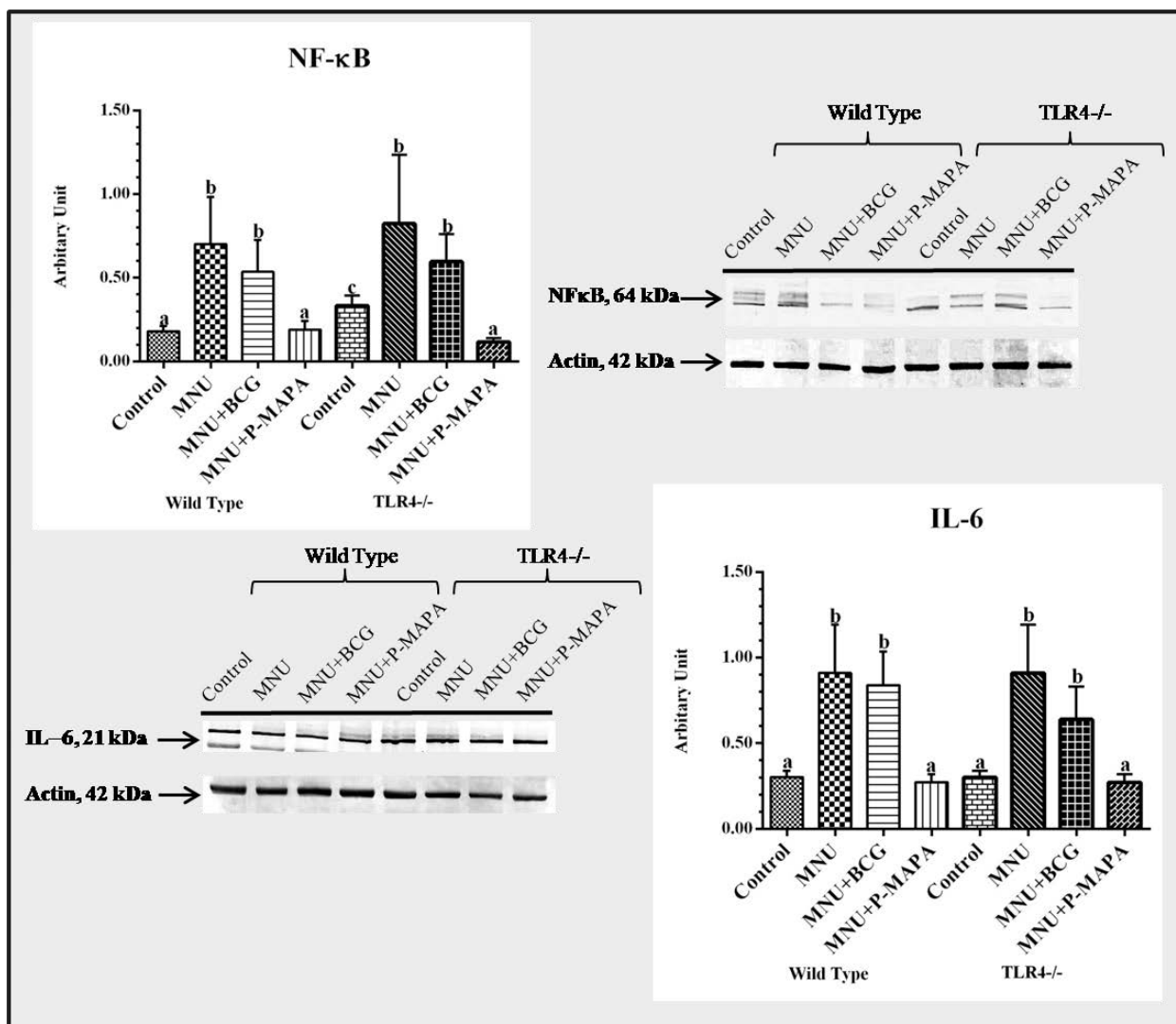


Figura 7: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas NFκB e IL-6 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e TLR4^{-/-}. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=05$)

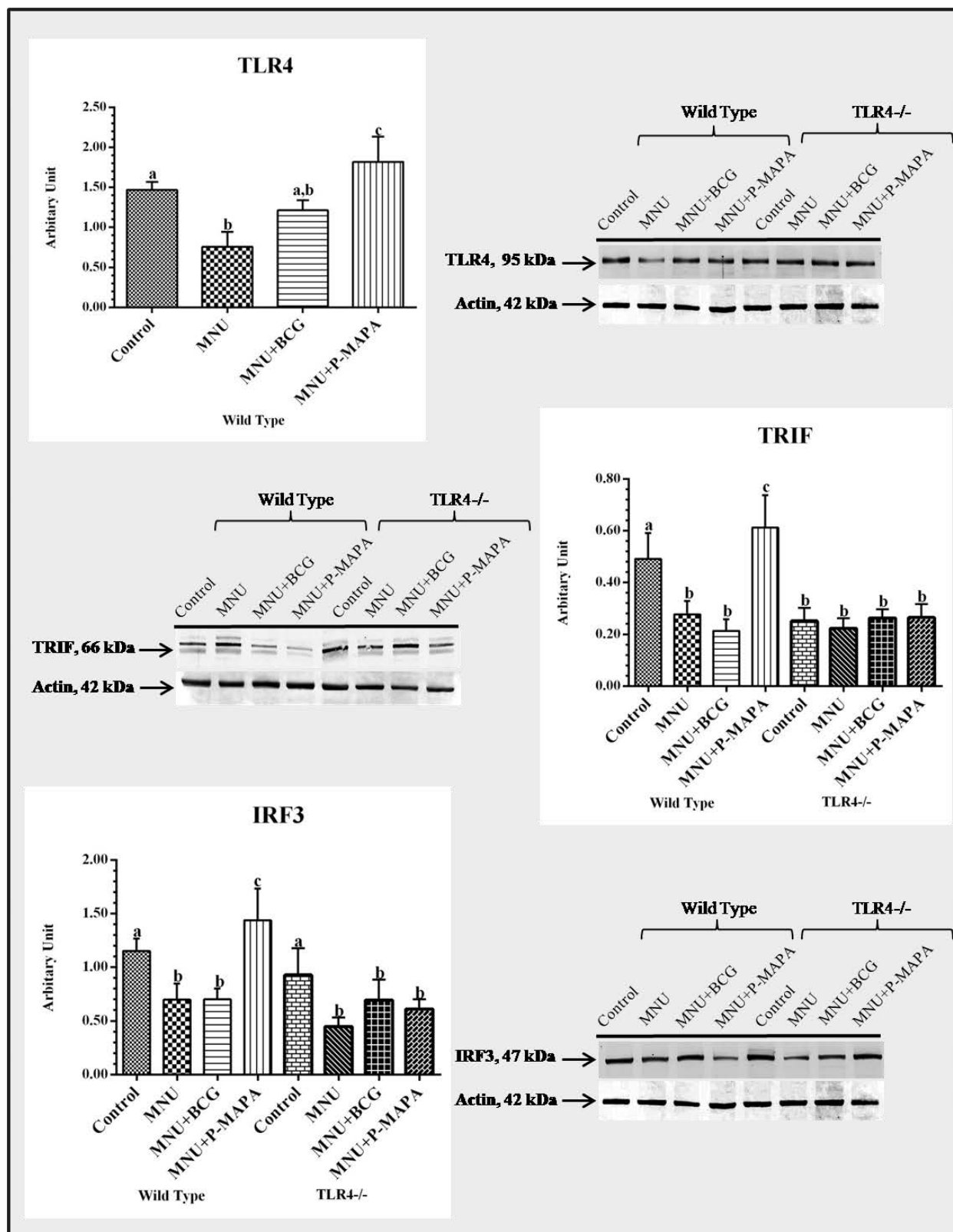


Figura 8: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas TLR4, TRIF e IRF3 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e *TLR4-/-*. Os níveis protéicos foram identificados nos *blot*s. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=05$)

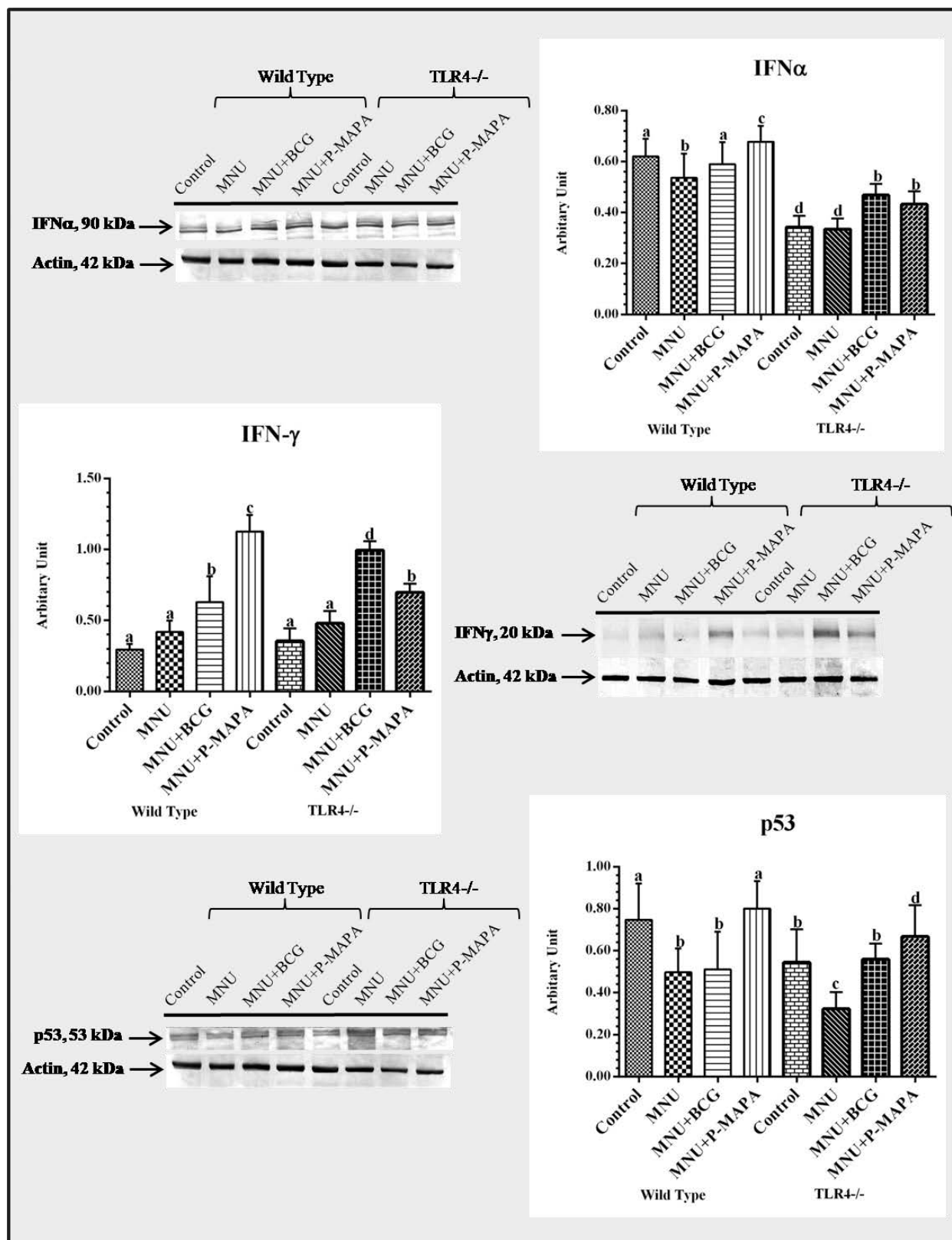


Figura 9: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas IFN- α , IFN- γ e p53 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e TLR4 $^{-/-}$. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 05$)

3.2.2 Animais TLR4-/-

Via dependente de MyD88 (canônica)

O nível protéico de TLR2 apresentou-se significativamente mais alto no grupo MNU+P-MAPA e MNU+BCG em relação aos grupos Controle e MNU e em relação aos grupos dos animais *Wild Type*. Para IKK- α os níveis protéicos significativamente mais altos foram nos grupos Controle e MNU+BCG seguidos por MNU+P-MAPA e MNU e não apresentou diferença estatisticamente significativa com os grupos dos animais *Wild Type*. Já para IKK- β o nível protéico foi significativamente mais alto no grupo MNU+BCG, seguido pelos grupos Controle, MNU+P-MAPA e MNU, e relacionando aos animais *Wild Type*, o grupo MNU apresentou níveis protéicos mais baixos em relação ao grupo MNU *Wild Type* e os grupos MNU+BCG e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos mais altos em relação aos grupos MNU+BCG e MNU+P-MAPA *Wild Type* (Figura 06).

Para NF κ B, o nível protéico foi significativamente mais baixo no grupo MNU+P-MAPA, seguido pelo grupo Controle e os grupos MNU e MNU+BCG apresentaram os níveis protéicos significativamente mais altos, e relacionando cada grupo ao mesmo grupo dos animais *Wild Type*, não houve diferença estatisticamente significativa. Já para IL-6, os níveis protéicos foram significativamente mais baixos nos grupos Controle e MNU+P-MAPA, e relacionando cada grupo ao mesmo grupo dos animais *Wild Type*, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 07).

Via dependente de TRIF (não canônica)

Para TRIF, os níveis protéicos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, mas comparando cada grupo ao mesmo grupo dos animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos significativamente mais altos. Para IRF3, os grupos MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA apresentaram os níveis protéicos significativamente mais baixos em relação ao grupo Controle, e comparando cada grupo ao mesmo grupo dos animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+P-MAPA apresentaram níveis significativamente mais baixos (Figura 08).

Para IFN- α , os níveis protéicos foram significativamente mais altos nos grupos MNU+BCG e MNU+P-MAPA em relação aos grupos Controle e MNU, mas comparando cada grupo ao mesmo grupo dos animais *Wild Type*, todos apresentaram níveis protéicos significativamente mais baixos. Já para IFN- γ , o nível protéico significativamente mais alto foi do grupo MNU+BCG, seguido pelos grupos MNU+P-MAPA, MNU e Controle, e em relação ao

mesmo grupo dos animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU não apresentaram diferença estatisticamente significativa, o grupo MNU+BCG apresentou níveis protéicos significativamente mais altos e o grupo MNU+P-MAPA apresentou níveis protéicos significativamente mais baixos (Figura 09).

Para p53, os níveis protéicos foram significativamente mais altos no grupo MNU+P-MAPA, seguido por Controle, MNU+BCG e MNU. Em comparação aos animais *Wild Type*, os grupos Controle, MNU e MNU+P-MAPS apresentaram níveis protéicos significativamente mais baixos de p53 e apenas o grupo MNU+BCG não apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 09).

3.2.3 Animais MyD88-/-

Via dependente de MyD88 (canônica)

Para TLR2 os níveis protéicos foram significativamente mais altos nos grupos Controle e MNU+P-MAPA, seguidos por MNU+BCG e MNU, quando comparados com os animais *Wild Type* todos apresentaram níveis protéicos significativamente mais altos. O nível protéico de IKK- α foi significativamente mais baixo no grupo MNU+BCG, e os grupos Controle, MNU e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos mais altos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Quando comparados com os animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+P-MAPA não apresentaram diferença significativa, o grupo MNU apresentou níveis protéicos mais altos que o mesmo grupo *Wild Type* e o grupo MNU+BCG apresentou níveis protéicos mais baixos. Para IKK- β , todos os grupos apresentaram níveis protéicos sem diferença estatisticamente significativa, no entanto, ao comparar com os animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+BCG apresentaram níveis protéicos mais baixos, e os grupos MNU e MNU+P-MAPA não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 10).

Para NF κ B, todos os grupos apresentaram níveis protéicos sem diferença estatisticamente significativa, no entanto, ao comparar com os animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+P-MAPA não apresentaram diferença significativa e os grupos MNU e MNU+BCG apresentaram níveis protéicos significativamente mais baixos do que os grupos MNU e MNU+BCG dos animais *Wild Type*. Para IL-6, todos os grupos apresentaram níveis protéicos sem diferença estatisticamente significativa. Ao comparar com os animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU+P-MAPA não apresentaram diferença significativa e os grupos MNU e MNU+BCG apresentaram níveis protéicos significativamente mais baixos (Figura 11).

Via dependente de TRIF (não canônica)

Para TLR4, os níveis protéicos foram significativamente mais altos no grupo MNU+P-MAPA, seguido pelos grupos Controle e MNU+BCG, e MNU. Em comparação com os animais *Wild Type* não houve diferença estatisticamente significativa. Para TRIF, os níveis protéicos foram mais altos no grupo MNU+P-MAPA, seguidos pelos grupos Controle, MNU e MNU+BCG. Já em comparação com os animais *Wild Type*, não houve diferença estatisticamente significativa. Para IRF3, os níveis protéicos foram significativamente mais altos no grupo Controle, enquanto os grupos MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos mais baixos diferença estatisticamente significativa entre eles. Ao comparar com os animais *Wild Type* os grupos Controle, MNU, MNU+BCG não apresentaram diferença estatisticamente significativa, e o grupo MNU+P-MAPA apresentou níveis protéicos significativamente mais baixos do que o mesmo grupo *Wild Type* (Figura 12).

Os níveis protéicos de IFN- α foram significativamente mais altos no grupo Controle, seguidos por MNU, MNU+ BCG e MNU+P-MAPA. Em comparação com os animais *Wild Type*, o grupo Controle não apresentou diferença estatisticamente significativa, e os grupos MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos significativamente mais baixos do que os mesmos grupos *Wild Type*. Para IFN- γ , os níveis protéicos foram mais altos no grupo Controle seguidos pelos grupos MNUe MNU+ BCG, e MNU+P-MAPA. Ao comparar com os animais *Wild Type*, os grupos Controle e MNU apresentaram níveis protéicos significativamente mais altos, o grupo MNU+BCG não apresentou diferença estatisticamente significativa, e o grupo MNU+P-MAPA apresentou níveis protéicos significativamente mais baixos (Figura 13).

Para p53, os níveis protéicos foram significativamente mais altos nos grupos Controle, MNU e MNU+P-MAPA e o grupo MNU+BCG apresentou níveis protéicos mais baixos de P53. Em comparação com os animais *Wild Type*, os grupos Controle, MNU e MNU+P-MAPA apresentaram níveis protéicos mais baixos de p53 e o grupo MNU+BCG não apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 13).

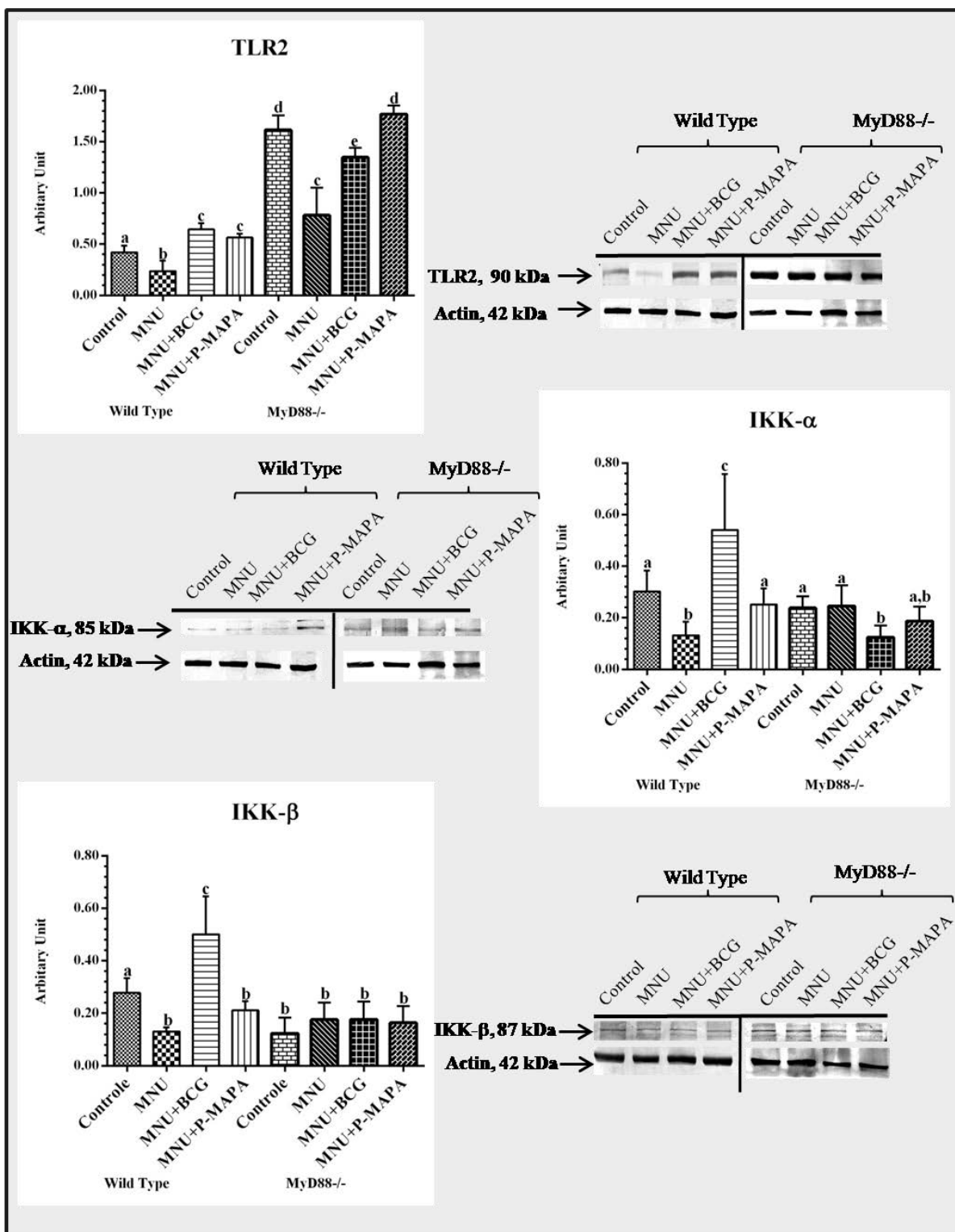


Figura 10: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas TLR2, IKK- α e IKK- β extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e *MyD88^{-/-}*. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 05$)

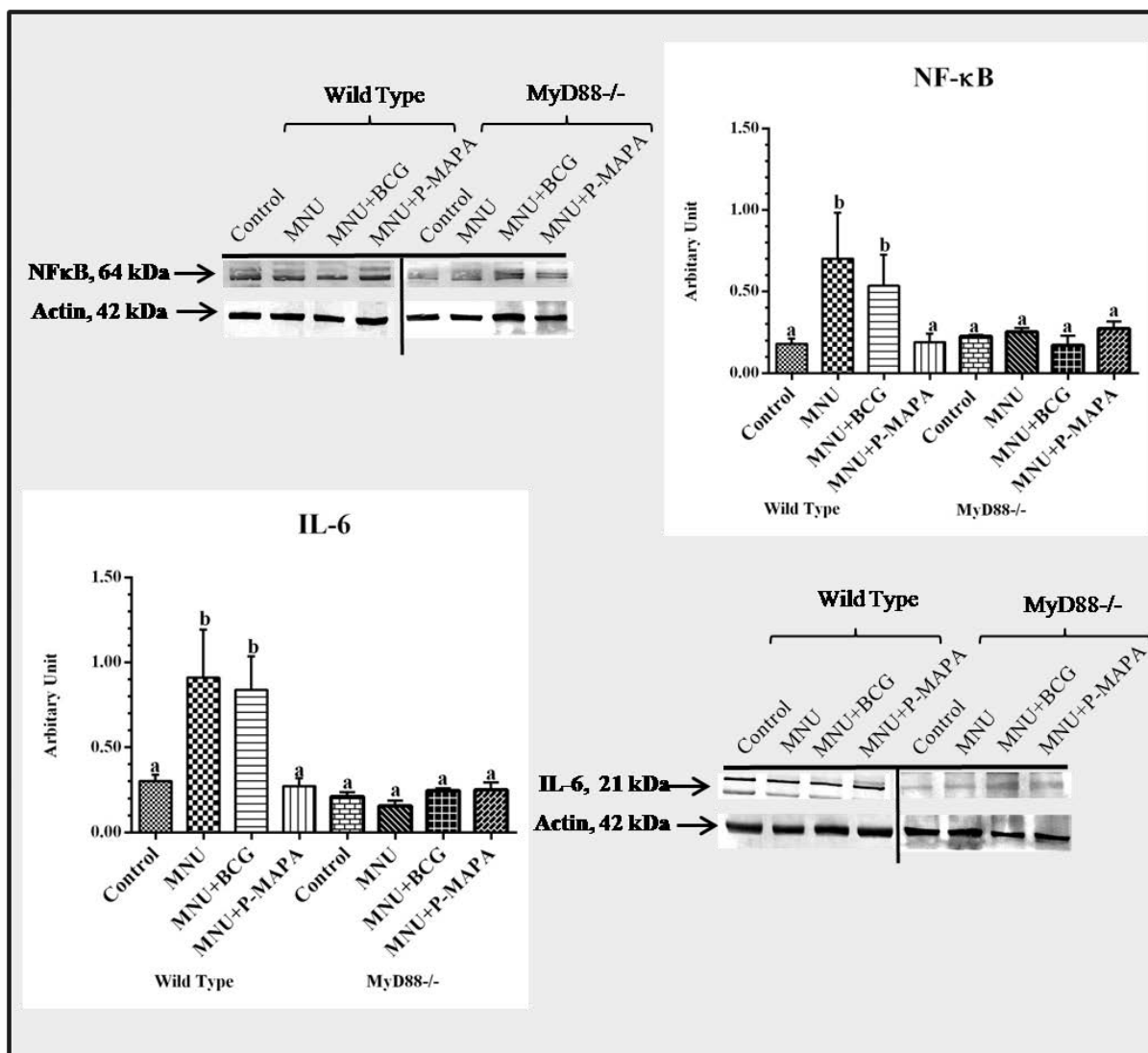


Figura 11: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas NFκB e IL-6 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e *MyD88^{-/-}*. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ($n= 05$)

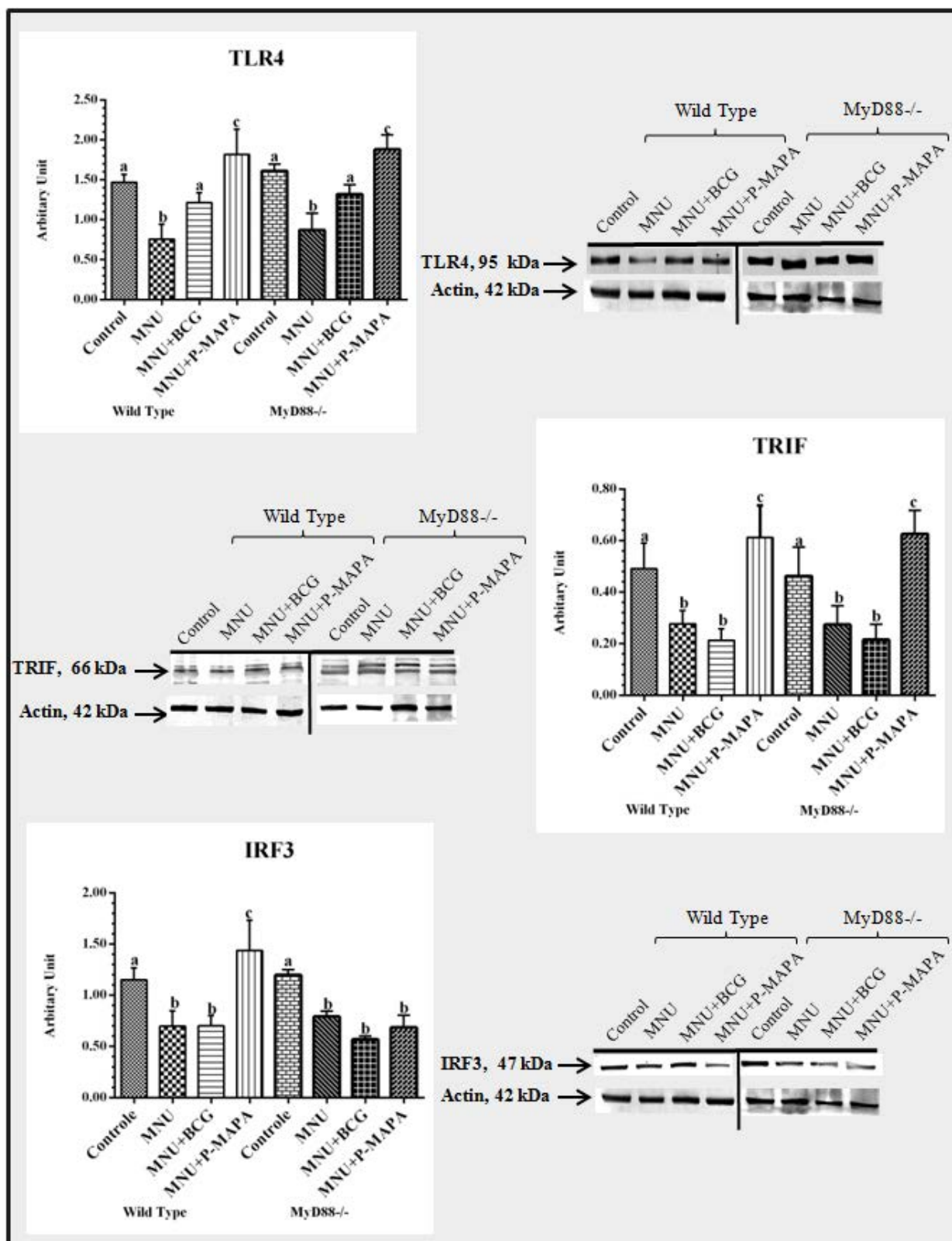


Figura 12: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas TLR4, TRIF e IRF3 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e *MyD88^{-/-}*. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 05$)

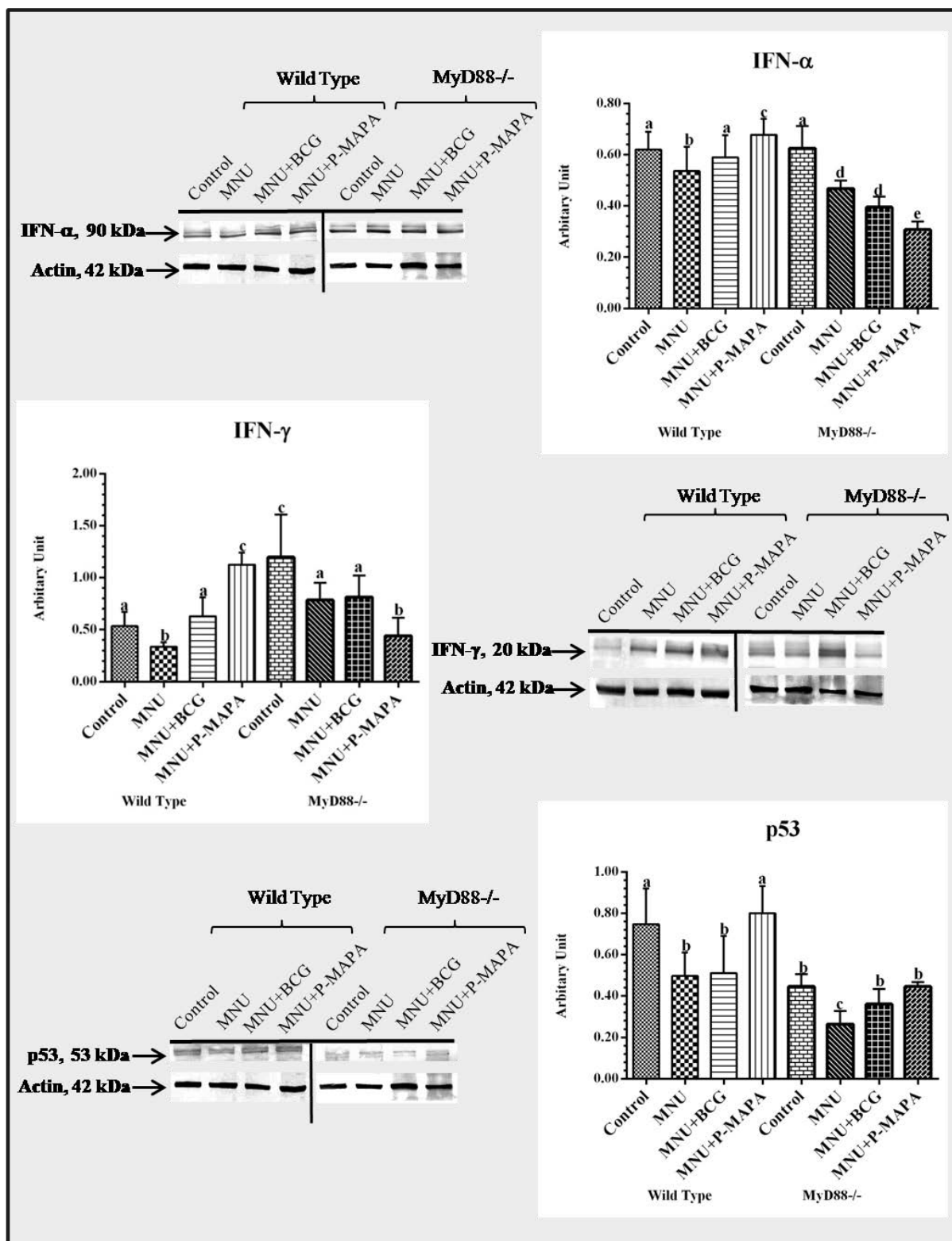


Figura 13: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas IFN- α , IFN- γ e p53 extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU+BCG e MNU+P-MAPA da linhagem de animais *Wild type* e *MyD88^{-/-}*. Os níveis protéicos foram identificados nos *blotts*. Actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=05$)

4. Discussão

A imunoterapia com BCG é a terapia de escolha para o CBNMI de alto risco, que reduz a recorrência e previne a progressão após a ressecção transuretral (Askeland et al., 2012). O efeito antitumoral do BCG ocorre através da ativação do sistema imune e indução de uma resposta inflamatória. Em algumas horas após a administração de BCG é possível identificar níveis mais altos de leucócitos na urina, bem como uma liberação de variadas citocinas e quimiocinas (De Boer et al., 1991; De Boer et al., 1992, Luo et al., 2007). Vários estudos demonstraram que a administração intravesical de BCG induz diferentes mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e a proteína induzível de interferon-10 (IP-10), os quais exercem potente efeito antitumoral e antiangiogênico (Pavlovich et al., 2000). Além disso, uma resposta imune do tipo Th1, com liberação de citocinas como IL-2, IL-12 e principalmente IFN- γ , parece ser favorável a uma terapia efetiva do BCG, enquanto que a elevada liberação de citocinas do tipo Th2, como IL-10 e IL-6, correlaciona-se com a falha no tratamento com BCG (Luo et al., 2003). Os efeitos antitumorais de BCG parecem estar relacionado a mecanismos imunes, que são refletidos na elevação transitória de muitas citocinas (Bohle et al., 1990; de Boer et al., 1992; Yu et al., 2007) e a presença de leucócitos imunocompetentes ativados (Patard et al., 1996; Yu et al., 2007) na urina 24 horas após instilação. Entretanto, o mecanismo celular dessa atividade após a interação com a parede celular da bexiga ainda é desconhecido.

No entanto, a taxa de resposta completa ao BCG é de 55-65% para Carcinoma Papilífero e 70-75% para Carcinoma *in situ*, o que indica que 30-45% dos pacientes não terão sucesso no tratamento, e 50% dos pacientes que apresentarem resposta completa ao BCG terão recorrência do câncer (Askeland et al., 2012). Além disso, devido aos efeitos colaterais, 20% dos pacientes são considerados intolerantes ao BCG (Askeland et al., 2012; Van der Meijden et al., 2003). Em vista disso, há a necessidade de aprofundamento na pesquisa com BCG, de forma a diminuir seus efeitos colaterais, e na pesquisa com fármacos alternativos no tratamento de CBNMI, como o agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA) que têm sido proposto com resultados promissores (Durán; Nunes, 1990; Nunes; Durán, 2003). Fávaro et al. (2012) demonstraram que o P-MAPA possui um importante efeito antitumoral no CBNMI. De acordo com esses autores, o P-MAPA aumentou os níveis proteicos de TLR2, TLR4 e p53 quando administrado intravesicalmente em animais com CBNMI induzido quimicamente, correlacionando com a regressão tumoral. Também, experimentos *in vitro* com células HEK293 relevaram que o tratamento dessas células com P-MAPA ativou o NF- κ B com consequente estimulação dos TLRs 2 e 4 (Fávaro et al., 2012). Assim concluiu-se que o P-MAPA atuou como

agonista dos TLRs 2 e 4 e ativou p53, melhorando o estado imunológico no CBNMI (FÁVARO et al., 2012).

Compostos que agem como agonista de receptores Toll-like (TLRs), ou seja, compostos ou moléculas que se ligam e ativam TLRs são objetos de intensa pesquisa e desenvolvimento para o tratamento do câncer. TLRs tem um importante papel na ativação da imunidade inata e adaptativa em resposta a patógenos e sinais de perigo (LaRue et al., 2013). Esses receptores são expressos em células imunes e em alguns epitélios (Ayari et al., 2011; LaRue et al., 2013). Eles são expressos no epitélio da bexiga urinária, onde participam ativamente contra infecções por patógenos (LaRue et al., 2013). A expressão dos TLRs é reduzida em cânceres de bexiga, especialmente em tumores não-músculo-invasivos (Ayari et al., 2011).

As vias de sinalização de TLR originam-se de domínios do receptor Toll/IL-1 intracitoplasmático (TIR), os quais são conservados entre todos os TLRs (Takeda & Akira, 2004). Evidências tem demonstrado que proteínas adaptadores contendo o domínio TIR, como MyD88, TIRAP e TRIF modulam as vias de sinalização (Takeda & Akira, 2004). MyD88 é essencial para a indução de citocinas inflamatórias induzidas por todos os TLRs (Takeda & Akira, 2004). TIRAP é essencialmente envolvida na via dependente de MyD88 (via canônica) através de TLR2 e TLR4, enquanto TRIF é envolvida na via independente de MyD88 (via não-canônica) mediada por TLR3 e TLR4.

A ativação de TLR em células tumorais pode levar a respostas antitumorais, muitos estudos tem demonstrado uma citotoxicidade direta de agonistas de TLR em linhagens celulares de câncer de bexiga e um efeito antitumoral *in vivo* (Hennessy et al., 2010; So & Ouchi, 2010; Goutagny et al., 2012; LaRue et al., 2013). Ainda que TLRs sejam mais expressos em células uroteliais normais, sua expressão e atividade persiste em células tumorais, oferecendo a possibilidade de utilizar ligantes de TLR para terapia. O sucesso da imunoterapia para CBNMI com BCG mediada por TLR sugere que imunoterapias alternativas baseadas em TLRs possam também ser bem sucedidas para esses cânceres. Estudos mostram que a resposta celular a micobactéria é dependente da sinalização de TLR. Por exemplo, camundongos deficientes para MyD88 demonstraram resistência reduzida a *M. Tuberculosis* comparados com Controles *Wild Type* (Scanga et al., 2004), enquanto que a linhagem celular uroepitelial Hu35E6E7 (que expressa muitos TLRs) induz a expressão de MyD88 na presença de lipoproteínas micobacterianas de BCG que são ligantes de TLR2 (Simmons et al., 2010). Polimorfismos de TLR2 tem sido associados com a suscetibilidade a *M. tuberculosis* em humanos (Huynh et al., 2011). TLR4 também está envolvida na resposta a micobactéria e estudos *in vitro* em células epiteliais humanas mostraram que BCG induziu a ativação da via ERK1/2 MAPK e secreção de

IL-8 através da sinalização de TLR2 e TLR4 (Mendez-Samperio et al., 2008; LaRue et al., 2013).

Os resultados histopatológicos do presente estudo evidenciaram tumor indiferenciado caracterizado por Carcinoma *in situ* (pTis), Carcinoma Papilífero (pTa) e Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1) no grupo MNU das linhagens *Wild Type*, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} demonstrando que o MNU foi efetivo na indução do CBNMI nesse modelo animal. Na linhagem *Wild Type* os animais submetidos a imunoterapia com BCG apresentaram mais frequentemente Carcinoma *in situ* (pTis) e Carcinoma Papilífero (pTa) e apenas 20% apresentou urotélio normal. Na linhagem TLR4^{-/-} todos os animais apresentaram câncer sendo o mais frequente o Carcinoma Papilífero (pTa). Contudo, na linhagem MyD88^{-/-} as alterações histopatológicas mais frequentes foram Carcinoma *in situ* (pTis), Carcinoma Papilífero de Alto Grau (pTa) e Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1), evidenciando que a ausência da molécula adaptadora MyD88 é de grande importância para a eficácia da imunoterapia com BCG.

Na linhagem *Wild Type*, os animais submetidos a imunoterapia com P-MAPA apresentaram melhores resultados, todos com urotélio normal. No entanto, na ausência de TLR4, apenas 60% dos animais apresentaram urotélio normal e os outros 40% apresentaram Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau e Carcinoma Papilífero (pTa), evidenciando que a falta de TLR4 reduz a eficácia da imunoterapia com P-MAPA. Contudo, na linhagem MyD88^{-/-} todos os animais apresentaram câncer sendo os mais frequentes Carcinoma Papilífero de Alto Grau (pTa) e Carcinoma Urotelial com Invasão de Lâmina Própria (pT1), também com presença de Metaplasia Escamosa, o que demonstra a importância de MyD88 para que a imunoterapia com P-MAPA seja eficaz.

Micobactérias BCG têm uma parede celular externa característica que consiste em várias biomoléculas estruturais complexas. Os componentes imunologicamente ativos destas biomoléculas atualmente conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes interagem com um conjunto de receptores de reconhecimento específicos, entre os quais os receptores Toll-like (TLR), em células do sistema imunológico do hospedeiro (Janeway et al., 2002). Os PAMPs da parede celular da micobactéria incluem peptidoglicanos, ácidos micólicos, lipoarabinomanana (LAM), lipomannan (LM). A ativação, maturação e produção de citocinas de células dendríticas são primariamente induzidas pela interação com TLR, no entanto todas micobactérias de BCG intactas interagem preferencialmente com TLR2 sobre TLR4 o que é corroborado pelos estudos de Dao et al (2004) e pelos resultados deste estudo, pois observou-se que os níveis protéicos para TLR4 e os intermediários de sinalização

não canônica foram significativamente menores no grupo MNU+BCG em relação ao grupo MNU+P-MAPA e os níveis protéicos de TLR2 e intermediários da via de sinalização canônica foram significativamente mais altos. No presente estudo, nos animais *Wild Type* tratados com BCG os níveis de TLR2 foram significativamente elevados e os níveis de TLR4 não apresentaram diferença significativa, enquanto nos animais tratados com P-MAPA os níveis de TLR2 e TLR4 foram significativamente elevados, indicando uma vantagem do P-MAPA em relação ao BCG. Nos animais TLR4^{-/-} tratados com BCG e P-MAPA os níveis de TLR2 foram significativamente elevados, indicando um desvio da via de sinalização para TLR2. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG e P-MAPA os níveis de TLR4 não apresentaram diferença significativa, pois o TLR4 está *upstream* em relação a MyD88.

O fator regulatório de interferon 3 (IRF3) é um fator transcricional que tem um papel crucial na ativação da imunidade inata e inflamação em resposta a infecção viral, e está também envolvida na inibição do crescimento celular dependente de p53 (Chattopadhyay et al., 2010; Kim et al., 2013). Honda et al. (2005) observou que camundongos deficientes em IRF3 infectados por vírus apresentaram sobrevivência significativamente reduzida. Chattopadhyay et al. (2010) verificou que a apoptose pode ser desecandeada pela interação direta de IRF3, através do domínio BH3, recentemente identificado, com a proteína pró-apoptótica BAX, sua co-translocação para a mitocôndria e a ativação da via apoptótica mitocondrial. Kim et al. (2013) demonstrou que direta ativação transcricional da proteína da leucemia promielocítica (PML) por IRF-3 resultou na inibição dependente de p53 das células normais e tumorais *in vitro* e *in vivo*, indicando uma nova via regulatória entre a resposta imune e a supressão tumoral. No presente estudo, nos animais *Wild Type* tratados com BCG os níveis de IRF3 não apresentaram diferença significativa, enquanto nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IRF3 foram significativamente elevados, indicando uma vantagem do P-MAPA em relação ao BCG. Nos animais TLR4^{-/-} tratados com BCG os níveis de IRF3 não apresentaram diferença significativa, enquanto nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IRF3 foram significativamente reduzidos, indicando a importância de TLR4 para a ativação de IRF3 e consequentemente a eficácia do P-MAPA. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG os níveis de IRF3 não apresentaram diferença significativa, enquanto nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IRF3 foram significativamente reduzidos, indicando a importância de MyD88 para a ativação de IRF3 e consequentemente a eficácia do P-MAPA.

A imunosobrevivência insuficiente é um importante aspecto no início da tumorigênese e na patogênese da doença maligna. No estágio mais avançado do câncer, o desenvolvimento de imunodeficiência é considerado a maior razão para progressão da doença e morte (Brandacher et

al., 2006; Tate et al., 2012). Shankaran et al. (2001) mostrou que a supressão tumoral do sistema imune é criticamente dependente das ações do IFN- γ que, ao menos em parte, são direcionadas em regular a imunogenicidade tumor-célula. O IFN- γ estimula muitas vias antiproliferativas em macrófagos e outras células e também em linhagens de células tumorais (Brandacher et al., 2006; Alshaker & Matalka, 2011; Tate et al., 2012). O IFN- γ é a citocina produzida por células T-helper 1 (Th1), mas também é derivada de células TCD8⁺, células natural killer (NK) e células T natural killer (NKT) (Martin-Fontecha et al., 2004; Li et al., 2007; Alshaker & Matalka, 2011). O IFN- γ exerce seus efeitos biológicos pela interação com os receptores de IFN- γ , IFNGR1 e IFNGR2 (Pestka et al., 1997; Alshaker & Matalka, 2011) resultando na ativação da via de sinalização (JAK)-STAT, que leva a fosforilação de duas moléculas STAT1, seguidas por sua dimerização e translocação nuclear (Schindler & Plumlee, 2008). Kaplan et al. (1998) demonstrou que camundongos sem receptores para IFN- γ ou deficiente para STAT1 desenvolveram tumores mais rapidamente e com maior frequência do que camundongos *Wild Type* induzidos com metilcolantreno (MCA) (Kaplan et al., 1998). A via de sinalização IFN- γ /STAT1 também tem sido envolvida na apoptose de células tumorais (Ikeda et al., 2002; Alshaker & Matalka, 2011). O IFN- γ pode induzir a apoptose de certas células transformadas através de mecanismos de sinalização envolvendo formação de complexos homodiméricos STAT1 ativados (Ikeda et al., 2002; Alshaker & Matalka, 2011). Esse processo resulta na indução dependente de IFN- γ /STAT1 de genes que codificam componentes intracelulares ou de membrana que promovem apoptose celular, como caspase-1 e IL-1 β converting enzyme (Chin et al., 1997) e Fas e Fas ligand (FasL) (Xu et al., 1998). No presente estudo, nos animais *Wild Type*, tanto BCG quanto P-MAPA foram capazes de elevar os níveis de IFN- γ , enquanto que na ausência de TLR4, apenas BCG foi capaz de elevar os níveis de IFN- γ , pois BCG interage preferencialmente com TLR2 e, através de um desvio da via para TLR2, IFN- γ é ativado. Isso indica a importância de TLR4 na terapia com P-MAPA. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG não houve diferença significativa nos níveis de IFN- γ , enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IFN- γ foram reduzidos, indicando a importância de MyD88 para sua eficácia.

No presente estudo, os resultados de *Western Blotting* dos animais *Wild Type* apresentaram para o grupo tratado com BCG níveis mais altos de TLR2, IKK- α e IKK- β e de IFN- α e IFN- γ , enquanto que para o grupo tratado com P-MAPA, os níveis dos intermediários da via de sinalização canônica (NF κ B e IL-6) diminuíram e os intermediários da via de sinalização não-canônica (TRIF, IRF3, IFN- α e IFN- γ), TLR2, TLR4, p53 e IKK- α aumentaram. Estudos indicam que os elevados níveis dos intermediários da via de sinalização não-canônica,

especialmente IFN- γ se relacionam com um melhor prognóstico e que elevados níveis dos intermediários da via de sinalização canônica, especialmente IL-6, relacionam-se com um pior prognóstico da doença (Chen et al, 2013; Brandacher et al., 2006). Esses resultados corroboram estudos do presente grupo de pesquisa que indicam que o P-MAPA age como agonista dos TLRs 2 e 4 e ativa p53, e também confirmam os resultados histopatológicos do presente trabalho, que apresentou urotélio normal em 100% dos animais tratados com P-MAPA (Fávaro et al., 2012).

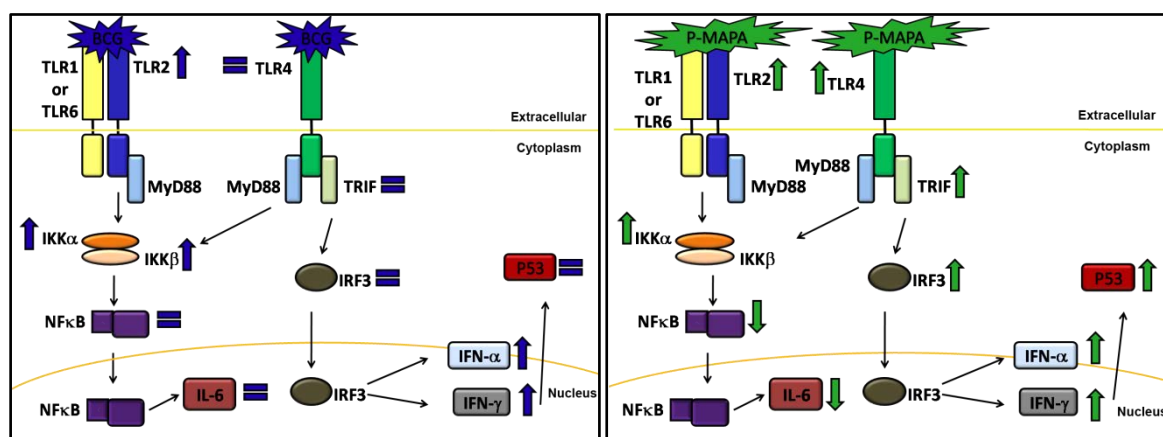


Figura 16: Representação das vias canônicas e não canônicas e relação dos níveis protéicos das proteínas de cada tratamento dos animais *Wild Type* em relação ao grupo MNU *Wild Type* . **Igual** - não houve diferença estatisticamente significativa. **Seta para cima** - apresentou níveis protéicos significativamente elevados. **Seta para baixo** - apresentou níveis protéicos significativamente reduzidos.

O p53 controla um notável número de funções fisiológicas, incluindo metabolismo, diferenciação, espécies reativas de oxigênio, e é estabilizado e ativado em resposta a diversos estresses, como dano ao DNA, hipóxia, ativação de oncogene, drogas, depleção de nucleotídeo (Toledo & Wahl, 2006; Vousden & Lane, 2007; Lim et al., 2009). Células que possuem uma via de p53 completamente funcional podem parar e reparar o dano causado por esses estresses precocemente ou sofrer a apoptose dependente de p53. p53 age como um fator de transcrição sequência-específico durante a apoptose (Haupt et al., 2003; Michalak et al., 2005; Vousden & Lane, 2007; Michalak et al., 2008; Lim et al., 2009), embora em alguns cenários, possa translocar para a mitocôndria e mediar morte celular por vários mecanismos independentemente ou em conjunção com uma nova transcrição gênica (Moll et al., 2005; Lim et al., 2009). BAX é considerada um importante gene alvo para a apoptose dependente de p53 (Haupt et al., 2003; Michalak et al., 2005; Moll et al., 2005; Vousden & Lane, 2007; Michalak et al., 2008; Lim et al., 2009). Em condições normais, p53 é uma proteína de vida curta devido a sua rápida degradação proteossomal. Essa degradação é mediada por um dos produtos gênicos do próprio

p53, Mdm2, que serve como uma E3 ubiquitina ligase para p53, embora a degradação de p53 independente de Mdm2 também exista (Aschcroft et al., 2000; Brune et al., 2001; Umansky & Schirmacher, 2001; Wang et al., 2002; Wang et al., 2003). Esse feedback negativo de p53-Mdm2 funciona como um dispositivo efetivo para restringir a atividade de p53 na ausência de estresse oncogênico (Michael & Oren, 2002). No presente estudo, os animais *Wild Type* tratados com BCG não apresentaram diferença significativa nos níveis de p53, enquanto que os animais tratados com P-MAPA apresentaram níveis elevados de p53. Nos animais TLR4^{-/-} tratados com BCG não houve diferença significativa nos níveis de p53, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de p53 foram reduzidos indicando a importância de TLR4 para a eficácia do tratamento. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG não houve diferença significativa nos níveis de p53, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de p53 foram reduzidos, indicando que a importância da proteína adaptadora MyD88 na eficácia do tratamento.

Como em muitos tipos celulares, a ativação de p53 em células associadas com o sistema imune pode alterar a expressão de muitos genes que codificam proteínas apoptóticas, inibidores do ciclo celular, e citocinas inflamatórias. Menendez et al. (2012) mostrou recentemente que muitos membros da família TLR era transcricionalmente regulados por p53 em resposta a diferentes fatores de estresse incluindo dano ao DNA (Menendez et al., 2011; Menendez et al., 2012; Shatz et al., 2012). A ativação de p53 pode alterar a expressão de TLRs em linhagens celulares cancerosas e levar a elevada expressão mediada por ligantes de citocinas downstream do correspondente TLR. As respostas de genes TLR individuais difere entre linhagens celulares (na maioria dos casos aumenta), tratamentos genotóxicos (doxorrubicina, 5-florouracil, radiação ionizante) e superexpressão de p53 (Menendez et al., 2012; Shatz et al., 2012). Assim, entender as mudanças na expressão gênica de TLR em tumores e células imune associadas a tumores em resposta ao dano de DNA e agentes indutores de p53 pode ser uma ferramenta útil em estratégias que utilizam TLRs como terapia para câncer (Menendez et al., 2011; Menendez et al., 2012).

Novas terapias que reativam (ou restauram) p53 *Wild Type* ou entregam p53 *Wild Type* para as células tumorais podem parar ou atrasar significativamente o crescimento celular (Bossi et al., 2007; Li et al., 2011; Menendez et al., 2012). Algumas dessas terapias envolvem drogas que devem alterar o p53 mutado e fazê-lo se comportar como um p53 wild type (Menendez et al., 2012). Outras terapias bloqueiam proteínas que degradam p53 em células tumorais, elevando os níveis de p53 e possivelmente causando morte celular. Nessa linha, a reativação farmacológica de p53 elevou a morte de células tumorais mediada por NK derivada de pacientes com tumores metastáticos de diferentes origens e de linhagens celulares tumorais (Li et al., 2011).

Os resultados do *Western Blotting* dos animais TLR4^{-/-} apresentaram para o grupo tratado com BCG níveis protéicos mais altos de TLR2 e IFN- γ e níveis protéicos mais baixos de IFN- α e IKK- α . As outras proteínas não sofreram diferença significativa em relação aos mesmos grupos dos animais *Wild Type*. Como o BCG interage preferencialmente com o TLR2, a ausência de TLR4 não apresentou diferença significativa nos níveis protéicos do grupo tratado com BCG. No entanto, no grupo tratado com P-MAPA os níveis protéicos mais altos foram de TLR2 e IKK- β e os níveis protéicos foram reduzidos nos intermediários da via não canônica (TRIF, IRF3, IFN- α e IFN- γ) e em p53, indicando que na ausência de TLR4 a via tende a ser deslocada para TLR2, dependente de MyD88. No entanto, o P-MAPA interage preferencialmente com TLR4 e a ativação da via dependente de TRIF leva a melhores resultados do tratamento, e correlacionando aos resultados histopatológicos dos animais TLR4^{-/-}, pode-se concluir que a ausência de TLR4 na via compromete a eficácia do tratamento com P-MAPA.

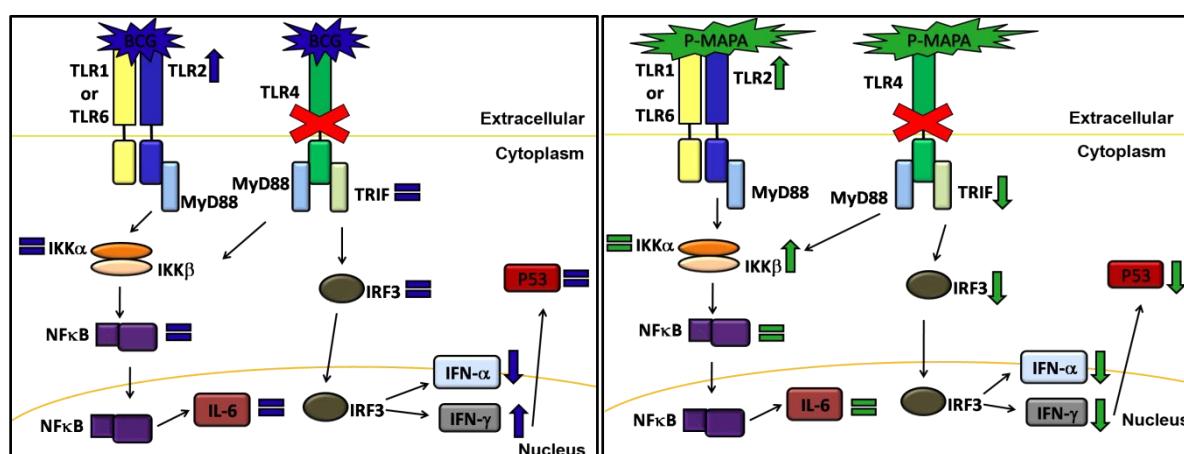


Figura 17: Representação das vias canônicas e não canônicas e relação dos níveis protéicos das proteínas de cada tratamento dos animais TLR4^{-/-} em relação ao mesmo tratamento dos animais *Wild Type*. **Igual** - não houve diferença estatisticamente significativa. **Seta para cima**- apresentou níveis protéicos significativamente elevados. **Seta para baixo** - apresentou níveis protéicos significativamente reduzidos.

O NF κ B é um importante promotor tumoral endógeno, ativando a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, como o IL-6, moléculas de adesão, iNOS e fatores angiogênicos. (Mantovani et al., 2008). Além disso, uma das mais importantes funções do NF κ B em células tumorais é promover a sobrevivência da célula induzindo a produção de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2. (Mantovani et al., 2008). O NF κ B é translocado para o núcleo onde se liga ao DNA para ativar a expressão de genes de citocinas como o IL-6, importante na resposta inflamatória e estudos comprovam que seus níveis relacionam-se com o crescimento tumoral, metástase e prognóstico ruim (Chen et al., 2013). No presente estudo, os animais *Wild Type*

tratados com BCG não apresentaram diferença significativa nos níveis de NFκB e IL-6, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de NFκB foram reduzidos. Nos animais TLR4^{-/-} tratados com BCG e nos animais tratados com P-MAPA não houve diferença significativa nos níveis de NFκB e IL-6, indicando que para a redução dessas citocinas o TLR4 não é importante. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG os níveis de NFκB e IL-6 foram reduzidos, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de NFκB e IL-6 não apresentaram diferença significativa, indicando que para BCG a ausência de MyD88 leva a redução de NFκB e IL-6, que seria uma vantagem para o tratamento, no entanto, o P-MAPA é capaz de reduzir os níveis de NFκB e IL-6 na ausência ou presença de MyD88.

No entanto, o NFκB fica retido no citoplasma por inibidores específicos chamados IκBs e através da degradação desses inibidores o NFκB é liberado para se translocar ao núcleo e ativar a transcrição de genes alvo (Bonizzi et al., 2004; Meng et al., 2010; Häcker et al., 2006). A degradação dos IκBs ocorre através de proteínas quinases chamadas IKK-α e IKK-β, que apesar de similares, podem ter funções diferentes (Bonizzi et al., 2004; Häcker et al., 2006). IKK-β é preferencialmente ativada por estímulos pró inflamatórios como TNF-α, IL-1 e agonistas de receptores *Toll-like*, como LPS (Bonizzi et al., 2004; Häcker et al., 2006). IKK-α é preferencialmente ativada em resposta a membros da família TNF, como BAFF (B cell-activating factor) e ligante CD40 (Bonizzi et al., 2004; Häcker et al., 2006). Enquanto a via dependente de IKK-β é essencial para ativação da imunidade inata, a via dependente de IKK-α é mais importante para a regulação da imunidade adaptativa e organogênese linfóide (Bonizzi et al., 2004; Häcker et al., 2006). No presente estudo, os animais *Wild Type* tratados com BCG apresentaram níveis significantemente elevados de IKK-α e IKK-β, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IKK-α foram elevados e de IKK-β não apresentaram diferença significativa. Nos animais TLR4^{-/-} tratados com BCG os níveis de IKK-α não apresentaram diferença significativa e os níveis de IKK-β foram reduzidos, enquanto nos animais tratados com P-MAPA os níveis de IKK-α não apresentaram diferença significativa e os níveis de IKK-β foram elevados, indicando que na ausência de TLR4 a via é deslocada para TLR2, elevando os níveis de IKK-β. Nos animais MyD88^{-/-} tratados com BCG os níveis de IKK-α e IKK-β foram reduzidos, enquanto que nos animais tratados com P-MAPA os níveis de NFκB e IL-6 não apresentaram diferença significativa, indicando que para BCG a ausência de MyD88 leva a redução de IKK-α e IKK-β, que seria uma vantagem para o tratamento, no

entanto, o P-MAPA é capaz de reduzir os níveis de NFκB e IL-6 na ausência ou presença de MyD88.

Os resultados de *Western Blotting* dos animais MyD88^{-/-} apresentaram para o grupo tratado com BCG níveis protéicos significativamente elevados para TLR2 e significativamente reduzidos para os intermediários da via canônica (IKK-α, IKK-β, NFκB e IL-6) e IFN-α. As demais proteínas não tiveram diferença estatisticamente significativa. Para o grupo tratado com P-MAPA os níveis protéicos foram elevados para TLR2 e foram reduzidos para os intermediários da via não canônica (IRF3, IFN-α e IFN-γ) e p53. Para as demais proteínas não houve diferença estatisticamente significativa, possivelmente porque o P-MAPA já reduz bastante essas proteínas mesmo nos animais *Wild Type*. Esses resultados, junto com os resultados histopatológicos, indicam a importância da molécula adaptadora MyD88 para a eficácia do tratamento com P-MAPA.

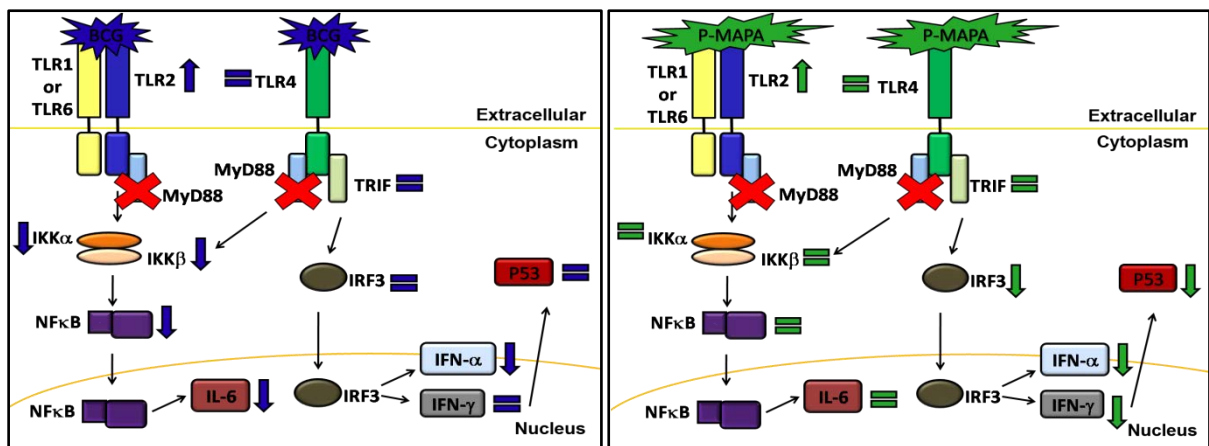


Figura 18: Representação das vias canônicas e não canônicas e relação dos níveis protéicos das proteínas de cada tratamento dos animais MyD88^{-/-} em relação ao mesmo tratamento dos animais *Wild Type*. **Igual** - não houve diferença estatisticamente significativa. **Seta para cima**- apresentou níveis protéicos significativamente elevados. **Seta para baixo** - apresentou níveis protéicos significativamente reduzidos.

5. Conclusões

- a) A imunoterapia com P-MAPA mostrou-se mais eficaz que BCG no modelo de CBNMI induzido por MNU.
- b) Na ausência de TLR4, as imunoterapias com BCG e P-MAPA não foram eficazes no modelo de CBNMI induzido por MNU.
- c) Na ausência de MyD88, as imunoterapias com BCG e P-MAPA não foram eficazes no modelo de CBNMI induzido por MNU.
- d) A imunoterapia com P-MAPA promoveu distinta ativação de TLR2, TLR4 e intermediários da via de sinalização não canônica (TRIF, IRF3, IFN- α e IFN- γ), e redução dos intermediários da via de sinalização canônica (IKK- α , IKK- β , NF κ B e IL-6). Enquanto que BCG não foi tão eficaz em ativar os intermediários da via de sinalização não canônica (TRIF, IRF3, IFN- α e IFN- γ), e reduzir os intermediários da via de sinalização canônica (IKK- α , IKK- β , NF κ B e IL-6) quando comparado com P-MAPA.
- e) Na ausência de TLR4, ocorreu um desvio para a via de sinalização canônica, por TLR2, principalmente pela imunoterapia com BCG, que interage preferencialmente com TLR2, demonstrando que o TLR4 é importante na imunoterapia com P-MAPA, pois na ausência deste há uma redução da sua eficácia.
- f) O adaptador MyD88 demonstrou papel essencial no compartilhamento das vias para produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons, sendo que sua ausência levou à ineficácia dos tratamentos com BCG e P-MAPA em todos os animais.
- g) A ação antitumoral do P-MAPA, bem como seu papel na restauração de p53 se mostraram dependentes da integridade do adaptador MyD88.
- h) A ativação da via de sinalização para interferons pelo P-MAPA foi mais efetiva no tratamento do CBNMI em relação à sinalização de citocinas inflamatórias mediadas por BCG, de modo que o P-MAPA pode ser considerado uma importante alternativa terapêutica para esse tipo de tumor.

6. Referências Bibliográficas

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*; v.4, pp.499–511, 2004.
- ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.*; v. 18, pp.3-10, 2008.
- ALSHAKER, H.A.; MATAKA, K. Z. IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer Cell Int*, v. 11, p.33, 2011.
- ALTEKRUSE, S.F.; KOSARY, C.L.; KRAPCHO, M.; NEYMAN, N.; AMINOU, R.; WALDRON, W.; RUHL, J.; HOWLADER, N.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; EISNER, M.P.; LEWIS, D.R.; CRONIN, K.; CHEN, H.S.; FEUER, E.J.; STINCHCOMB, D.G.; EDWARDS BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, *National Cancer Institute. Bethesda, MD*. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Overview: bladder cancer. In: How many people get bladder cancer? *American Cancer Society, Atlanta*. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/overviewguide/bladder-cancer-overview-key-statistics>. Acesso em 17/02/2015.
- ANDREAS, B.O.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.*; v.170, pp.964–969, 2003.
- ASHCROFT, M.; TAYA, Y.; VOUSDEN, K.H. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol.* v. 20, n. 9, pp. 3224-33, 2000.
- ASKELAND, E.J.; NEWTON, M.R.; O'DONNELL, M.A.; LUO, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol.*; v.2012, pp.181987, 2012.
- AYARI, C.; BERGERON, A.; LARUE, H.; MÉNARD, C.; FRADET, Y. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. *J Urol.* v.185, n. 5, pp. 1915-21, 2011.
- BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol.*; v.16, pp.38-52, 2006.
- BOHLE, A.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin Immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.*; v.170, pp.964–969, 2003.
- BÖHLE, A.; NOWC, C.; ULMER, A.J.; MUSEHOLD, J.; GERDES, J.; HOFSTETTER, A.G.; FLAD, H.D. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2, and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J Urol*, v. 144, pp. 59–64, 1990.
- BONIZZU, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, v. 25, n.6, pp. 280-8, 2004.
- BOSSI, G.; SACCHI, A. Restoration of wild-type p53 function in human cancer: relevance for tumor therapy. *Head Neck*, v. 29, pp. 272-284, 2007.
- BOTTEMAN, M.F.; PASHOS, C.L.; REDAELLI, A.; LASKIN, B.; HAUSER, R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. v. 21, n.18, pp. 1315-30, 2003.

BRANDACHER G, PERATHONER A, LADURNER R, SCHNEEBERGER S, OBRIST P, WINKLER C, WERNER ER, WERNER-FELMAYER G, WEISS HG, GOBEL G, MARGREITER R, KONIGSRAINER A, FUCHS D, AMBERGER A. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res.* v. 12, pp. 1144–1151, 2006.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.*: v.197, pp.1119-24, 2003.

BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Transcription factors p53 and HIF-1alpha as targets of nitric oxide. *Cell Signal.* v. 13, n. 8, pp. 525-33, 2001.

CARDILLO, M.R.; SALE, P.; DI SILVERIO, F. Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. *Anticancer Res.*: v.20, pp. 4579-83, 2000.

CHATTOPADHYAY S., MARQUES J.T., YAMASHITA M., PETERS K.L., SMITH K., DESAI A., WILLIAMS B.R., SEN G.C. Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *EMBO J.* v. 29, pp. 1762-73. 2010.

CHEN, Z.; QIAN, Q.; TANG, C.; DING, J.; FENG, Y.; MA, G. Association of two variants in the interleukin-6 receptor gene and premature coronary heart disease in a Chinese Han population. *Mol. Biol. Rep.* v. 40, pp. 1021-1026, 2013.

Chin, Y.E.; Kitagawa, M.; Kuida, K.; Flavell, R.A.; Fu, X.Y. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* v. 17, n. 9, pp. 5328-5337, 1997.

COHEN, S.M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. *Toxicol Pathol.*: v. 30, pp.663-71, 2002.

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

DAO, D.N., KREMER, L., GUERARDEL, Y., MOLANO, A., JACOBS, W.R., JR, PORCELLI, S.A., AND BRIKEN, V. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and IL-12 production in macrophages. *Infect. Immun.* v. 72, pp. 2067–2074, 2004.

DE BOER, E.C.; DE JONG, W.H.; STEERENBERG, P.A.; AARDEN, L.A.; TETTEROO, E.; DE GROOT, E.R.; VAN DER MEIJDEN, A.P.; VEGT, P.D.; DEBRUYNE, F.M.; RUITENBERG, E.J. Induction of urinary interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-6, and tumour necrosis factor during intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* v. 34, pp. 306–312, 1992.

DE BOER, E.C.; DE JONG, W.H.; VAN DER MEIJDEN, A.P.; STEERENBERG, P.A.; WITJES, J.A.; VEGT, P.D.; DEBRUYNE, F.M.; RUITENBERG, E.J. Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Immunol. Immunother.* v. 33, pp. 411–416, 1991.

DURÁN, N.; JUSTO, G.Z.; SOUZA-BRITTO, A.R.M. SB-73/P-MAPA: Protein magnesium phospholipoleate-palmitoleate anhydride. *Drugs Fut.*; v.22, pp.454, 1997.

DURÁN, N.; NUNES, O.D.S. Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-7 Strain). *Brazilian J Med Biol Res.*; v.23, pp.1289-1302, 1990.

DURÁN, N.; SOUZA BRITO, A.R.M.; HAUN M. SB-73: Immunomodulator Agent. *Drugs Fut.*; v.18, pp.327-334, 1993.

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

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

FUKUSHIMA, S.; COHEN, S.M.; ARAI, M.; JACOBS, J.B.; FRIEDEL, G.H. Scanning electron microscopic examination of reversible hyperplasia of the rat urinary bladder. *Am J Pathol.*; v. 102, pp.373-80, 1981.

GALLI, R.; STARACE, D.; BUSÀ, R.; ANGELINI, D.F.; PAONE, A.; DE CESARIS, P.; FILIPPINI, A.; SETTE, C.; BATTISTINI, L.; ZIPARO, E.; RICCIOLI, A. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol.*; v.184, pp.6658-6669, 2010.

GOUTAGNY, N.; JIANG, Z.; TIAN, J.; PARROCHE, P.; SCHICKLI, J.; MONKS, B.G.; ULBRANDT, N.; JI, H.; KIENER, P.A.; COYLE, A.J.; FITZGERALD, K.A. Cell type-specific recognition of human metapneumoviruses (HMPVs) by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and TLR7 and viral interference of RIG-I ligand recognition by HMPV-B1 phosphoprotein. *J Immunol.* v. 184, pp. 1168–1179, 2010.

GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; SEIDEL, A.; JACOB, J. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ.*; v. 247, pp.81-90, 2000.

HÄCKER, H.; KARIN, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* n. 357, re13, 2006.

HALL, M.C.; CHANG, S.S.; DALBAGNI, G.; PRUTHI, R.S.; SEIGNE, J.D.; SKINNER, E.C.; WOLF, J.S. JR.; SCHELLHAMMER, P.F. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol.*; v.178, pp.2314-2330, 2007.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* v. 116, Pt 20, pp. 4077-85, 2003.

HENNESSY, E.J.; PARKER, A.E.; O'NEILL, L.A. Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov.* v. 9, pp. 293–307, 2010.

HICKS, R.M.; WAKEFIELD, J.S. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. *Chem Biol Interact.*; v.5, pp.139-52, 1972.

HONDA, K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; ASAGIRI, M.; SATO, M.; MIZUTANI, T.; SHIMADA, N.; OHBA, Y.; TAKAOKA, A.; YOSHIDA, N.; TANIGUCHI, T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, v. 434 pp. 772–777, 2005.

HUANG, B.; ZHAO, J.; LI, H.; HE, K.L.; CHEN, Y.; CHEN, S.H.; MAYER, L.; UNKELESS, J.C.; XIONG, H. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.*; v.65, pp. 5009-14, 2005

HUYNH, K. K.; JOSHI, S. A.; BROWN E. J. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr. Opin. Immunol.* v. 23, pp. 464–472, 2011.

IKEDA, H.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The roles of IFN gamma in protection against tumour development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 13, pp. 95–109, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014. In: Incidência de Câncer do Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em 17/02/2015.

JANEWAY , C.A. JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition , *Annu Rev Immunol.* v. 20, pp. 197-216, 2002.

JEGO, G.; BATAILLE, R.; GEFFROY-LUSEAU, A.; DESCAMPS, G.; PELLAT-DECEUNYNCK, C. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia.* v.20, pp.1130-7, 2006.

JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M.L.S. Effects on splenic T lymphocytes in Ehrlich ascites tumor-bearing mice (EAT) induced by P-MAPA - Role of cytokines. *Int J Mol Med.*; v.4, pp.S49, 1999.

JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M.L.S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokines profile in tumour-bearing mice treated with P-MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. *Immunopharm Immunotoxicol.*; v.25, pp.305-319, 2003.

KAPLAN, D.H.; SHANKARAN, V.; DIGHE, A.S.; STOCKERT, E.; AGUET, M.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumour surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 95, pp. 7556–7561, 1998.

KEMP, T.J.; LUDWIG, A.T.; EAREL, J.K.; MOORE, J.M.; VANOOSTEN, R.L.; MOSES, B.; LEIDAL, K.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood.*; v.106, pp.3474-3482, 2005.

KIM, H. J., JEONG, J. S., KIM, S. R., PARK, S. Y., CHAE, H. J., AND LEE, Y. C. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF-kappaB/HIF-1alpha signaling pathway. *Sci. Rep.* 3, 1142. 2013.

KIRKALI, Z.; CHAN, T.; MANOHARAN, M.; ALGABA, F.; BUSCH, C.; CHENG, L.; KIEMENEY, L.; KRIEGMAIR, M.; MONTIRONI, R.; MURPHY, W.M.; SESTERHENN, I.A.; TACHIBANA, M.; WEIDER, J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, v. 66, n.6, Suppl 1, pp.4-34, 2005.

KRIEG, A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.*; v.117, pp.1184–1194, 2007.

KROFT, S.H.; OYASU, R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. *Lab Invest.*; v.71, pp.158–174, 1994.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.*; v.30, pp.16-34, 2011.

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

LARUE, H.; AYARI, C.; BERGERON, A.; FRADET, Y. Toll-like receptors in urothelial cells--targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol.* v. 10, n. 9, pp. 537-45, 2013.

LI, H.; LAKSHMIKANTH, T.; GAROFALO, C.; ENGE, M.; SPINNLER, C.; ANICHINI, A.; SZEKELY, L.; KÄRRE, K.; CARBONE, E; SELIVANOVA, G. Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle.* v. 10, pp. 3346–58, 2011.

LI, Z.; PRADERA, F.; KAMMERTOENS, T.; LI, B.; LIU, S.; QIN, Z. Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN- γ -dependent tumor rejection. *J Immunol.* v. 179, pp. 1568–1576, 2007.

LIM, L.Y.; VIDNOVIC, N.; ELLISEN, L.W.; LEONG, C.O. Mutant p53 mediates survival of breast cancer cells. *Br J Cancer.* v. 101, n. 9, pp. 1606-12, 2009.

LU, M.L.; WIKMAN, F.; ORNTOFT, T.F.; CHARYTONOWICZ, E.; RABBANI, F.; ZHANG, Z.; DALBAGNI, G.; POHAR, K.S.; YU G.; CORDON-CARDO, C. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin Cancer Res.*; v.8, pp.171-9, 2002.

LUO, J.L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.*; v.115, pp.2625–2632, 2005.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine.*; v. 21, pp. 17–26, 2003.

LUO, Y.; CHEN, X.; O'DONNELL, M. A. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces human CC- and CXC-chemokines *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.*; v. 147, pp. 370–378, 2007.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature.*; v. 454, pp.436-44, 2008.

MARTÍN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L.L.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* ; v. 5, n. 12, pp. 1260-5, 2004.

MELO, A.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. Stimulation of myelopoiesis in Listeria monocytogenes-infected mice by an aggregated polymer isolated from Aspergillus oryzae. *Human Exp. Toxicol.*; v. 20, pp.38-45, 2001.

MENDEZ-SAMPERIO, P.; TREJO, A.; PEREZ, A. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces CCL5 secretion via the Toll-like receptor 2-NF-κB and -Jun N-terminal kinase signaling pathways. *Clin. Vaccine Immunol.* v. 15, pp. 277-283, 2008.

MENENDEZ, D.; RESNICK, M. A.; HARAN, T. E. Transactivation by low and high levels of human p53 reveals new physical rules of engagement and novel super-transactivation sequences. *Cell Cycle*; v. 11, pp. 4287-4288, 2012.

MENENDEZ, D.; SHATZ, M.; AZZAM, K.; GARANTZIOTIS, S.; FESSLER, M.B.; RESNICK, M.A. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet.* v. 7, n. 3, e1001360, 2011.

MENG, Q.; PENG, Z.; CHEN, L. Nuclear Factor-κB modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. *Cancer Lett.*; v.299, pp.45-53, 2010.

MICHAEL, D.; OREN, M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* v. 12, n. 1, pp. 53-9, 2012.

MICHALAK, E.M.; VILLUNGER, A.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ.* v. 15, pp.1019–1029, 2008.

MICHALAK, E.; VILLUNGER, A.; ERLACHER, M; STRASSER, A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 331, pp. 786- 798, 2005.

MOLL, U.M.; WOLFF, S.; SPEIDEL, D.; DEPPERT, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current Opinion in Cell Biology*, London, v.17, pp. 631-636, 2005.

MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol.*; v.13, pp.143-153, 2005.

MORALES, A. EIDINGER, D.; BRUCE, A.W. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol.*; v.115, pp.377-380, 1976.

NETTO, G.J. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nat Rev Urol.*; v.9, pp.41-51, 2011.

NUNES, I.S.; DURÁN, N. Imunomodulador agregado proteico de anidrido de fosfolinoleato-palmitoleato de amônia e magnésio e processo de sua obtenção e formulação. Nº Patente: PI0305373-3. Depósito no INPI: 06/11/2003.

OKAMOTO, M.; HATTORI, K.; OYASU, R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer*.: v.72, pp.149-54, 1997.

OLIVEIRA, P.A.; COLACO, A.; DE LA CRUZ, P. L.F.; LOPES, C. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp Oncol*.: v.28, pp.2-11, 2006.

OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem Toxicol*.: v. 33, pp.747-55, 1995.

PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*.:v.18, pp.6853-66, 1999.

PAONE, A.; STARACE, D.; GALLI, R.; PADULA, F.; DE, C.P.; FILIPPINI, A.; ZIPARO, E.; RICCIOLI, A. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- α -dependent mechanism. *Carcinogenesis*; v.29, pp.1334–1342, 2008.

PATARD, J.J.; MUSCATELLI-GROUX, B.; SAINT, F.; POPOV, Z.; MAILLE, P.; ABBOU, C.; CHOPIN, D. Evaluation of local immune response after intravesical bacille Calmette–Guerin treatment for superficial bladder cancer. *Br J Urol*. v. 78, pp. 709–714, 1996.

PAVLOVICH, C.P.; KRÄLING, B.M.; STEWART, R.J.; CHEN, X.; BOCHNER, B.H.; LUSTER, A.D.; POPPAS, D.P.; O'DONNELL, M.A. BCG-induced urinary cytokines inhibit microvascular endothelial cell proliferation. *J. Urol*., v.163, p.2014-2021, 2000.

PERABO, F.G.; WILLERT, P.L.; WIRGER, A. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res*.; v. 25, pp.3565-3573, 2005.

PESTKA, S.; KOTENKO, S.V.; MUTHUKUMARAN, G.; IZOTOVA, L.S.; COOK, J.R.; GAROTTA, G. The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*. v. 8, pp. 189–206, 1997.

PHAM, C.G.; BUBICI, C.; ZAZZERONI, F. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*; v.119, pp.529–542, 2004.

PIKARSKY, E.; PORAT, R.M.; STEIN, I.; ABRAMOVITCH, R.; AMIT, S.; KASEM, S.; GUTKOVICH-PYEST, E.; URIELI-SHOVAL, S.; GALUN, E.; BEN-NERIAH, Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*.: v.431, pp.461-6, 2004.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*; v.9, pp.57–63, 2009.

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.

RO, J. Y.; STAERKEL, G. A.; AYALA, A. G. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*.; v.19, pp. 435–453, 1992.

SANTIAGO, M.E.; NETO, L.S.; ALEXANDRE, E.C.; MUNARI, D.P.; ANDRADE, M.M.; SOMENZARI, M.A.; CIARLINI, P.C.; DE LIMA, V.M. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Trop*. v. 127, n. 3, pp. 174-80, 2013.

SCANGA, C.A.; BAFICA, A.; FENG, C.G.; CHEEVER, A.W.; HIENY, S.; SHER, A. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect. Immun.* v. 72, pp. 2400–2404, 2004.

SCHAMHART, D.H.; BOER, E.C.; REIJKE, T.M. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol.*; v.37, pp.16, 2000.

SCHINDLER, C.; PLUMLEE, C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin Cell Dev Biol*; v. 19, pp. 311–318, 2008.

SCHULTZEL, M.; SALTZSTEIN, S.L.; DOWNS, T.M.; SHIMASAKI, S.; SANDERS, C.; SADLER, G.R. Late age (85 years or older) peak incidence of bladder cancer. *J. Urol.* vol. 179, n.4, pp. 1302-5, 2008.

SEGUCHI, T.; YOKOKAWA, K.; SUGAO, H.; NAKANO, E.; SONODA, T.; OKUYAMA, A. Interleukin-6 activity in urine and serum in patients with bladder carcinoma. *J Urol.*: v.148, pp.791-4, 1992.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A.T.; WHITE, J.M.; SWANSON, P.E.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature.*; v. 410, pp. 1107–1111, 2001.

SHARIAT, S.F.; LOTAN, Y.; KARAKIEWICZ, P.I.; ASHFAQ, R.; ISBARN, H.; FRADET, Y.; BASTIAN, P.J.; NIELSEN, M.E.; CAPITANIO, U.; JELDRES, C.; MONTORSI, F.; MÜLLER, S.C.; KARAM, J.A.; HEUKAMP, L.C.; NETTO, G.; LERNER, S.P.; SAGALOWSKY, A.I.; COTE, R.J. p53 predictive value for pT1-2 N0 disease at radical cystectomy. *J Urol.*: v.182, pp.907-13, 2009.

SHATZ, M.; MENENDEZ, D.; RESNICK, M.A. The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. *Cancer Res.* v. 72, n. 16, pp. 3948-57, 2012.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*; v.62, pp.10–29, 2012.

SIEVERT, K.D.; AMEND, B.; NAGELE, U.; SCHILLING, D.; BEDKE, J.; HORSTMANN, M.; HENNENLOTTER, J.; KRUCK, S.; STENZL, A. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J. Urol.*, v. 27, n. 3, pp. 295-300, 2009.

SIMMONS, D.P.; CANADAY, D.H.; LIU, Y.; LI, Q.; HUANG, A.; BOOM, W.H.; HARDING, C.V. *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 agonists inhibit induction of type I IFN and class I MHC antigen cross processing by TLR9. *J. Immunol.*; v. 185, pp. 2405–2415, 2010.

SINGH, R.; PERVIN, S.; CHAUDHURI, G. Caspase-8-mediated BID cleavage and release of mitochondrial cytochrome c during Nomega-hydroxy-L-arginine-induced apoptosis in MDA-MB-468 cells. Antagonistic effects of L-ornithine. *J Biol Chem.* v. 277, pp.37630–37636, 2002.

SO, E.Y.; OUCHI, T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci.* v. 6, n. 7, pp. 675-81, 2010.

SONG, J.; DUNCAN, M.J.; LI, G.; CHAN, C.; GRADY, R.; STAPLETON, A.; ABRAHAM, S.N. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathog.*: v.3, pp. 60, 2007.

SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H.H. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia.*: v.11, pp.615-28, 2009.

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.

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

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.*;v.16, pp.3-9, 2004

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*: v.21, pp. 335-76, 2003.

TATE, C.R.; RHODES, L.V.; SEGAR, H.C.; DRIVER, J.L.; POUNDER, F.N.; BUROW, M.E.; COLLINS-BUROW, B.M. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast Cancer Res.* v. 14. n. 3, R79, 2012.

TOLEDO, F.; WAHL, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer.*; v. 6, n. 12, pp.909-23, 2006.

UMANSKY, V.; SCHIRRMACHER, V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. *Adv Cancer Res.*; v. 82, pp. 107-31, 2001.

VAN DER MEIJDEN, A. P. M.; SYLVESTER, R. J. ; OOSTERLINCK, W. ; HOELTL, W.; BONO, A. V. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European organisation for research and treatment of cancer genito-urinary group phase III trial, *European Urology*, vol. 44, no. 4, pp. 429–434, 2003.

VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* v. 8, n. 4, pp.275-83, 2007.

WANG, W.; TAKIMOTO, R.; RASTINEJAD, F.; EL-DEIRY, W.S. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol.* v. 23, n. 6, pp.2171-81, 2003.

WANG, X.; MICHAEL, D.; DE MURCIA, G.; OREN, M. p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. *J Biol Chem.*; v. 277, n. 18, pp.15697-702, 2002.

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

XU, J.P.; LI, X.; MORI, E.; GUO, M.W.; MORI T. Aberrant expression and dysfunction of Fas antigen in MRL/MpJ-lpr/lpr murine ovary. *Zygote*, v. 6, n. 4, pp. 359–367, 1998.

YU, D.S.; LEE, C.F.; CHANG, S.Y. Immunotherapy for orthotopic murine bladder cancer using bacillus Calmette-Guerin recombinant protein Mpt-64. *J Urol.*; v. 177, n. 2, pp.738–742, 2007.

ZEEGERS, M.P.; GOLDBOHN, R.A.; VAN DEN BRANDT, P.A. A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control.*: v.13, pp.83-90, 2002.

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.

7. Anexos



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/02/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 168/14 intitulado: “**Caracterização dos mecanismos de ação da imunoterapia intravesical com P-MAPA envolvendo as vias de sinalização dos receptores Toll-like (TLR) 2 e 4 na progressão do câncer de bexiga não músculo invasivo**” que utilizará 120 animais da espécie camundongo, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Wagner José Fávaro

Pesquisador (a) Executante: Camila Morais Melo

CEUA-FMUSP, 25 de Fevereiro de 2015



**Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais**