



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



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

**ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA GEHLEN**

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

*Prof Dr. Wagner José Fávaro*

**BOTUCATU - SP  
2016**

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



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

**ANA CLAUDIA DA SILVA LIMA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO**

**CO-ORIENTADOR: NELSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**

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

*Prof Dr. Wagner José Fávaro*

**BOTUCATU - SP  
2016**

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

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

Lima, Ana Claudia da Silva.

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

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

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

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

**Botucatu, 1 de novembro de 2016.**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

(Orientador - UNICAMP/Campinas – SP)

---

Prof. Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho

(USP/São Paulo – SP)

---

Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

(UNICAMP/Campinas – SP)

---

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

(UNICAMP/Campinas – SP)

---

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

(UNESP/Botucatu - SP)

---

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

(UNESP/Botucatu - SP)

---

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

(USP/São Carlos – SP)

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

(USP/São Paulo – SP)

---

**Dedico este trabalho:**

**à Deus**

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

**À minha família**

Guerreiros incansáveis!

**Ao meu amado esposo Paulo Gehlen**

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

## **Agradecimentos**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Lista de abreviaturas**

**ATF2/cjun** Fator Ativador de Transcrição 2 cjun

**ARE** Elemento de resposta antioxidante

**AP** Proteína de ativação

**AUM** Unidades Assimétricas de Membrana

**BCG** *Bacillus Calmette – Guerin*

**CB** Câncer de bexiga urinária

**CBNMI** Câncer de bexiga não-músculo invasivo

**CFU-GM** Unidade formadora de colônia - granulócitos/macrófagos

**CD** Cluster de Diferenciação

**COX** Ciclo Oxigenase

**CPR** Proteína C reativa

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DSC** Calorimetria Diferencial de Varredura

**DSC** Desmocolina

**DSG** Desmogleína

**EGFR** Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

**ERKs** Proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular

**EROs** Espécies reativas de oxigênio

**ECM** Matrix Extra Celular

**FGF** Fator de crescimento fibroblástico

**GMCSF** Fator estimulante de colônias de macrófagos

**HIF** Fator transcricional indutor de hipóxia

**IFN** Interferon

**IP** Proteína Induzível

**IRF 3** Fator Regulador de Interferon 3

**IL** Interleucina

**iNOS** Síntese de Óxido Nítrico Induzível

**INCA** Instituto Nacional do Câncer

**ICAM** Molécula de Adesão Intercelular

**JNK** cJun N-terminal Quinase

**LAM** lipoarabinomanana

**LM** lipomannan

**MAPK** Proteína Kinase Ativada por Mitógeno

**MyD88** Fator de Diferenciação Mielóide 88

**MMPs** Metaloproteinases de matriz

**MNU** N-metil-N-nitrosureia

**MEV** Microscopia Eletrônica de Varredura

**NADPH** Hidrogênio fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NO** Óxido Nítrico

**NCI** Instituto Nacional do Câncer, EUA

**NF- $\kappa$ B** Fator de transcrição nuclear Kappa Beta

**NRF2** Fator de transcrição eritróide 2

**NK** *Natural Killer*

**NOX** Número de oxidação

**PAMPs** Padrão Molecular Associado a Patógeno

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

**pH** Potencial Hidrogeniônico

**PDI** Índice de Polidispersidade

**RPMI** Roswell Park Memorial Institute

**PPR** Receptores de Reconhecimento Padrão

**RTU** Ressecção transuretral

**SBR** Sulforrodamina B

**SFB** Soro Fetal Bovino

**SUS** Sistema Único de Saúde

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

**TRIF** Domínio TIR contendo adaptador-indutor de Interferon- $\beta$

**TIR** Toll/IL-1 receptor

**TLRs** Receptores de toll-like

**TNF** Fator de necrose tumoral

**TCA** ácido tricloroacético

**UP** Uroplaquina

**VEGF** Fator de crescimento vascular endotelial

**VCAM** Molécula de Adesão Celular Vascular

**vMAF** Fibrossarcoma Músculo Aponeurótico

**XRD** Raio X de Difração

**XRF** Raio X de Fluorescência

**WHO** Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

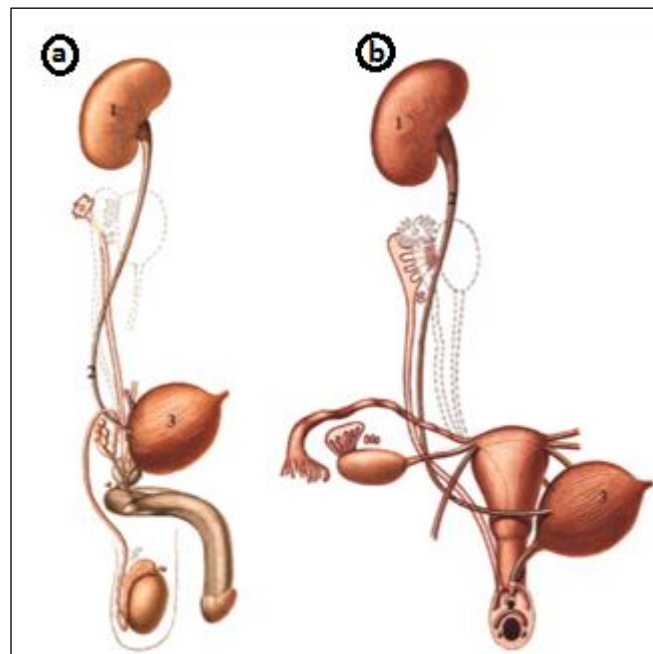
## SUMÁRIO

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

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema Urinário

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1.2 Carcinoma de Bexiga Urinária

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

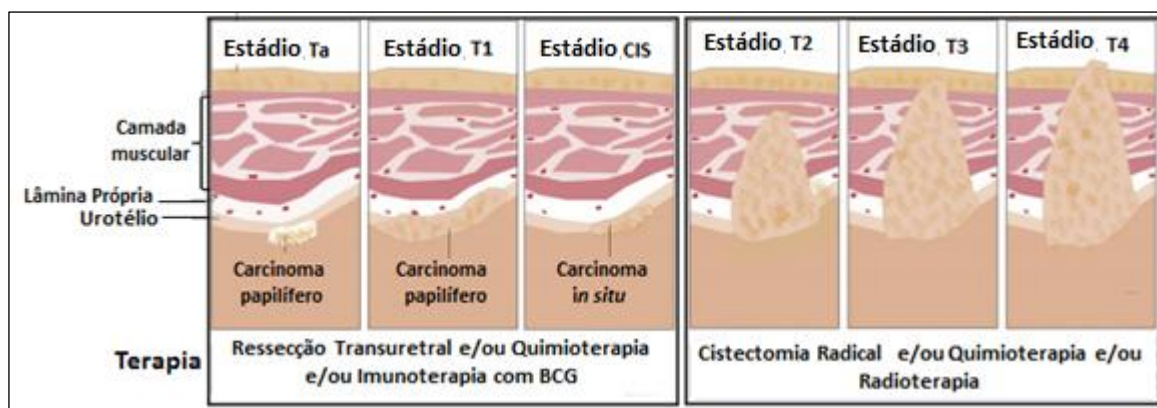
O câncer de bexiga (CB) é uma doença que envolve o urotélio. O urotélio consiste de células epiteliais que revestem estruturas como a pélvis renal, os ureteres, a bexiga e a uretra (Pang e Catto, 2013). Segundo a Sociedade Americana do Câncer o CB é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário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

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

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

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

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



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

### 1.2.1 Fatores de Risco

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1.2.2 Tipos de Carcinoma de Bexiga Urinária

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

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

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

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

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

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

### 1.2.3 Classificação histológica

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

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

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

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

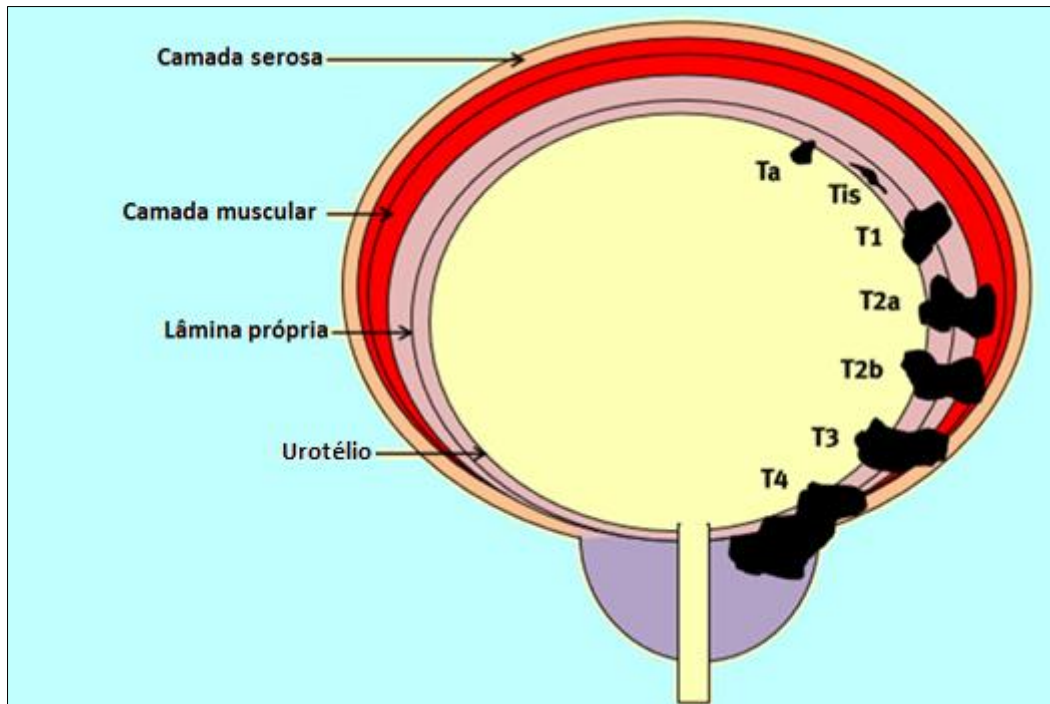
Entre outras mudanças, a principal diferença foi o agrupamento dos tumores: grau 1 – carcinoma urotelial papilífero de baixo grau e graus 2 e 3 – carcinoma papilífero de alto grau (**Tabela 1**). Com relação ao prognóstico, tumores de alto grau apresentam maior possibilidade de recidiva e progressão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

### 1.2.4 Estadiamento

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

**Tabela 2.** Classificação do Câncer de Bexiga

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



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

## 2. JUSTIFICATIVA

A imunoterapia com BCG é a forma mais eficaz de terapia intravesical para a profilaxia da recorrência e progressão do câncer de bexiga não-músculo invasivo. Contudo, a imunoterapia com BCG está frequentemente associada com efeitos adversos locais e/ou sistêmicos, incluindo sepse, além de recorrência tumoral em até 31% 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. Também é importante ressaltar que a disponibilidade da BCG no Sistema Único de Saúde (SUS), por muitas vezes, é baixa e apesar disso, até hoje, não há no mercado nenhum outro medicamento mais eficaz que a BCG. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos, são muito relevantes. Nesta linha, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas ou o melhoramento de fármacos já existentes, como por exemplo, a associação destes fármacos com nanotecnologia, para o tratamento de câncer como 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 neoplasias, incluindo o CB. Os estudos iniciais do nosso grupo mostraram que no tratamento *in vivo* do CBNMI com P-MAPA houve regressão do câncer mostrando um importante efeito antitumoral deste imunomodulador, indicando o grande potencial deste fármaco no tratamento do CBNMI (Fávaro et al., 2012; Garcia et al., 2016). Entretanto, a atual e as novas terapias de CBNMI tem grandes obstáculos a enfrentar como, por exemplo, aumentar o seu tempo de residência na parede da bexiga urinária e aumentar a sua penetração no urotélio. Isto porque estes dois fatores podem estar relacionados a baixa eficácia das terapias contra o CBNMI. Além disso, a redução do número de instilações pode diminuir os índices de infecções nos pacientes.

As formulações convencionais são mantidas na bexiga urinária durante 2 horas e a exposição urotelial ao fármaco perdura até a primeira micção após a instalação. Assim, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas na nanotecnologia, para aumentar o tempo de permanência e a penetração de fármacos administrados pela via intravesical, é fundamental para o tratamento da progressão e recorrência do CBNMI. Nesta linha, o carreamento de fármacos, como o P-MAPA, é uma estratégia muito relevante pois através desta

técnica é possível a obtenção de formulações aquosa deste fármaco com liberação prolongada do mesmo. Além disso, estas partículas podem ser preparadas com polímeros com propriedades mucoadesivas, como o pluronic e a quitosana. Esse tipo sistema nanoestruturado tem grandes vantagens no tratamento de CBNMI tais como, aumentar o tempo de residência do imunomodulador P-MAPA no urotélio e prolongar a sua liberação, e eventualmente diminuir o número de instilações intravesicais, e aumentar a sua penetração ampliando, desta forma, a sua ação para CB músculo-invasivo. Dessa maneira, o índice de infecções, que são comuns em pacientes que recebem a terapia por via intravesical, será reduzido e a eficácia do imunomodulador P-MAPA poderá ser melhorada.

Outro ponto relevante, para o aumento da eficácia do tratamento do CBNMI, é o estudo dos mecanismos de reparo tecidual e angiogênese. O planejamento adequado e o emprego das diferentes estratégias terapêuticas no CBNMI que dependem de diversos fatores, os quais incluem o entendimento dos processos de reparo celular e angiogênese, a identificação dos compostos que possam atuar como bloqueadores de EROs, bem como a sua distribuição no urotélio, e seu mecanismo de ação. Assim, o conhecimento da interação das diferentes modalidades terapêuticas envolvendo nanoestruturas com os mecanismos de angiogênese e reparo celular, bem como com as proteínas envolvidas na organização estrutural e molecular do urotélio (uropiaquinas, desmocolinas e desmogleínas) são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial. Além disso, a combinação desses marcadores moleculares pode ser útil na avaliação diagnóstica e prognóstica do carcinoma urotelial. Desta forma, este projeto tem grande relevância científica e tecnológica ampliando o conhecimento dos mecanismos de progressão do CBNMI e no desenvolvimento de uma nova formulação baseada em sistemas de liberação sustentada com grande potencial de geração de patente, além de artigos científicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Preparar e caracterizar as nanopartículas por diferentes técnicas físico-químicas;
- Comparar os efeitos histopatológicos e moleculares do imunomodulador P-MAPA, estabilizado e nanonizado com quitosana e pluronic, com a imunoterapia com BCG no tratamento do CBNMI induzido em ratas. Além disso, objetiva-se estabelecer os efeitos dessas estratégias terapêuticas envolvendo fatores indutores e reparadores de lesão celular, EROs e angiogênese.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a estabilidade das nanopartículas em diferentes meios;
- Caracterizar a histopatologia do CBNMI em ratos induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente às imunoterapias intravesicais com BCG e formulações micro e nanoestruturadas de P-MAPA;
- Comparar a organização e a distribuição das proteínas estruturais do urotélio uroplaquina (UP), desmocolina (DSC) e desmogleína (DSG) por análises de *Western Blotting* no CBNMI de ratos induzidos quimicamente frente às imunoterapias intravesicais com BCG e formulações micro e nanoestruturadas de P-MAPA;
- Comparar por meio de *Western Blotting* o envolvimento das imunoterapias intravesicais com BCG e formulações micro e nanoestruturadas de P-MAPA com as enzimas formadoras de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (NOX1 e NOX4) no CBNMI em ratos induzidos quimicamente;
- Caracterizar e comparar os efeitos das imunoterapias intravesicais com BCG e formulações micro e nanoestruturadas de P-MAPA sobre os fatores indutores e reparadores de lesão celular (TLRs 2 e 4, NRF2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, p53, IFN- $\gamma$ , IRF3, ), bem como o balanço angiogênico e antiangiogênico (HIF1 $\alpha$ , VEGF, MMP2, Endostatina) por *Western Blotting* no CBNMI em ratos induzidos quimicamente.

## **4. RESULTADOS**

Os resultados obtidos nesta tese estão divididos em 2 capítulos:

- **Capítulo 1. Desenvolvimento de Novas Modalidades Terapêuticas no Tratamento do Carcinoma de Bexiga Urinária: Imunomodulador P-MAPA e Nanotecnologia.**
  
- **Capítulo 2. P-MAPA e o carcinoma de bexiga urinária não músculo invasivo (CBNMI): Mecanismos de reparo de lesão, EROS e angiogênese.**

## 4.1 Capítulo 1

### **Desenvolvimento de Novas Modalidades Terapêuticas no Tratamento do Carcinoma de Bexiga Urinária: Imunomodulador P-MAPA e Nanotecnologia**

#### **RESUMO**

O câncer de bexiga (CB) é o quarto tipo de câncer mais comum em homens. O tratamento mais eficaz para este tipo de câncer é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) que, entretanto, ocasiona efeitos colaterais de intensidades variadas e altas taxas de recorrência e isso pode estar relacionado com os baixos efeitos dessa terapia atual sobre os mecanismos de reparo tecidual, EROS e angiogênese. Desta forma, o desenvolvimento de novas moléculas ou o melhoramento de fármacos já existentes que reduzam o número de instilações intravesicais, as taxas de recorrência e progressão tumoral e os efeitos colaterais é muito relevante. Diante deste cenário destaca-se o imunomodulador P-MAPA abrindo uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o CBNMI. Assim, o objetivo deste estudo foram caracterizar o imunomodulador P-MAPA, estabilizado com quitosana e pluronic para utilização no tratamento da progressão do CBNMI. Para tal, o P-MAPA foi nanonizado utilizando a quitosana e o pluronic como estabilizante nas formulações. A caracterização das formulações se deu por técnicas microscópicas, diâmetro e carga superficial, análises térmicas e de raio X. O presente estudo comprovou que a utilização do Pluronic como estabilizante para o desenvolvimento de formulações de compostos terapêuticos mostrou-se eficiente na proteção do produto contra alterações ou perdas pela variação do pH urinário. Assim, o P-MAPA nanonizado na presença de pluronic é um potencial candidato para o tratamento do CBNMI.

**Palavras-chave:** câncer de bexiga, P-MAPA, pluronic F68, quitosana, nanotecnologia.

## 1. Introdução

Em geral, o tratamento de CB é realizado por terapia intravesical. Esta terapia tem como vantagem comparativa a diminuição dos efeitos sistêmicos que os fármacos utilizados no tratamento de doenças do trato urotelial causam quando administrados por via intravenosa. Em geral, pela via intravenosa é necessário a administração de doses mais altas do fármaco já que estes não são específicos sendo, que uma parte é distribuída pelo organismo, além dos mesmos sofrerem metabolização e excreção antes de ter sua ação no local específico (Capaz et al., 1988). Por este motivo os efeitos adversos são mais pronunciados.

Desta forma, o ideal é a administração do fármaco no local onde sua ação é desejada, pois esta estratégia pode aumentar a eficácia farmacológica e diminuir a dose do fármaco necessária para a obtenção do efeito desejado diminuindo, assim, os efeitos tóxicos (Capaz et al., 1988). Nesta linha, a via intravesical para a administração de fármacos no trato urinário tem sido muito utilizada já que, a bexiga é um órgão de fácil acesso e, portanto, adequada para terapia tópica, por esta via é possível expor a área lesionada (bexiga/tumores) diretamente ao fármaco e a quantidade de fármaco administrado pode ser facilmente controlada (Adiyat et al., 2010).

### 1.1 Imunomodulador P-MAPA

O câncer de bexiga (CB) é caracterizado por lesões superficiais, apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica. Segundo Richie e D'amico (2005), 70% dos cânceres vesicais não invadem a túnica muscular deste órgão, contudo 20% - 30% apresentam progressão e 70% recorrência pós-tratamento exclusivo com ressecção transuretral (RTU). Por outro lado, sabe-se que a instilação intravesical do bacilo Calmette-Guerin (BCG) diminuiu esses índices para 31% (Richie e D'amico, 2005). Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CB superficial com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CB superficial de alto risco, sendo considerada a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (Andreas e Brandau, 2003).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune intensa caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células

inflamatórias na parede vesical. Citocinas como  $\text{TNF-}\alpha$ , 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 e 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 investigação (Schamhart et al., 2000). Ainda, Pook et al. (2002) demonstraram que células tumorais do CB que foram tratadas com BCG combinado com o antioxidante *N-acetilcisteína* causou significativa redução de EROs e aumento da citotoxicidade nas células cancerosas e sugeriram que os efeitos não-imunológicos do BCG podem determinar a resposta antitumoral.

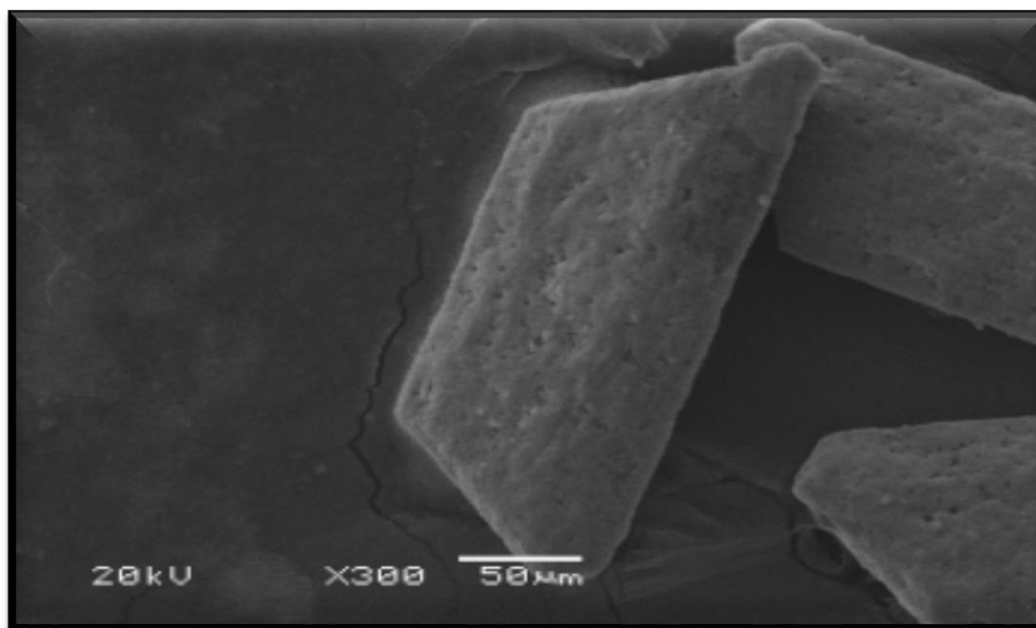
Contudo, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente, prostatite granulomatosa, pneumonite, hepatite, artralgia, hematúria, obstrução ureteral, epididimite, bexiga contraída, abscesso renal, septicemia e óbito em casos mais graves, comprometendo sua utilização (Bhole e Brandau, 2003; Walsh et al., 2007; Matheus, 2010). 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 (Durán e Nunes, 1990; Nunes e Durán, 2003; Perabo et al., 2005). 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).

O P-MAPA é um produto em desenvolvimento pela rede de pesquisas Farmabrilis (FARMABRASILIS, 2014) que está organizada segundo o modelo de fonte aberta de pesquisa e desenvolvimento (FARMABRASILIS, 2014).

A rede Farmabrilis é uma organização de pesquisas brasileira, sem finalidades lucrativas, que possui previsão de cessão gratuita de seus produtos para programas de saúde pública quando estes estiverem direcionados para o tratamento de doenças negligenciadas e ao atendimento de populações de baixa renda (FARMABRASILIS, 2014).

Os principais componentes da molécula são  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ , 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  $\mu\text{m}$  (**Figura 1**) e apresenta baixa solubilidade em água ( $< 1 \text{ mg/mL}$ ) sendo difícil a sua administração em solução aquosa.



**Figura 1** 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 imomodulador mostrou-se capaz de combater doenças infecciosas, virais e alguns tipos de neoplasias (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- $\gamma$ ) 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 mielopoiética está relacionado à sua atividade antitumoral como um possível mecanismo de regulação na produção de CFU-GM e expressão de suas atividades funcionais.

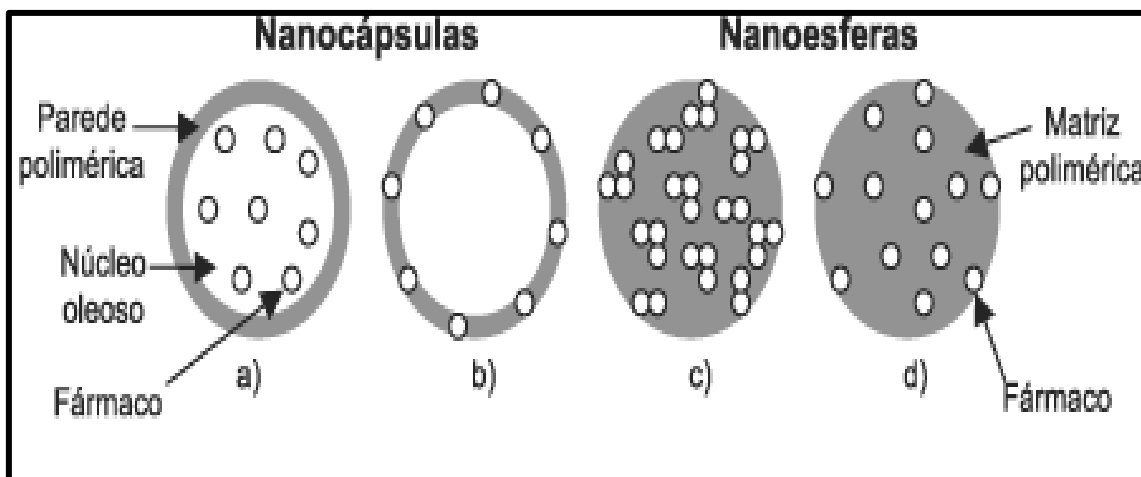
Também, Melo et al. (2001) avaliaram os efeitos do P-MAPA no número de CFU-GM na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e concluíram que

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. 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 mais recentes com o P-MAPA mostraram a capacidade de atuação do composto em viroses de alto potencial patogênico (Duran et al., 2009), e ainda em tuberculose (Favaro et al., 2012) e Leishmaniose visceral canina (Melo et al., 2014, Santiago et al., 2013).

Entretanto, visando a sua aplicação como agente terapêutico intravesical, a eficácia deste fármaco pode ser melhorada através de formulações em nanopartículas poliméricas que podem aumentar a sua penetração e a sua adesão no urotélio além de prolongar a liberação do mesmo diminuindo assim o número de instilações intravesicais.

## 1.2 Sistemas de liberação sustentada

As nanopartículas poliméricas foram introduzidas no mercado cosmético em 1995 pela L'Oréal. Estas partículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (**Figura 2**). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick et al., 2003).



**Figura 2** Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (SCHAFFAZICK, et al., 2003).

Na área farmacológica, em geral, as nanopartículas poliméricas são preparadas com polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com diâmetro em torno de 200-300 nm. A penetração e transporte são dependentes da composição química dos materiais de cobertura das partículas (polímeros e estabilizantes), do mecanismo de encapsulamento, o que influencia diretamente na liberação do fármaco, no diâmetro das nanopartícula e na viscosidade das formulações. Foi claramente demonstrado que as nanopartículas poliméricas são capazes de modificar a atividade dos fármacos, controlando sua liberação, aumentando sua adesividade ou tempo de permanência na pele ou em mucosas (Ridolfi et al., 2012, Guterres et al., 2007).

Independente do método de nanonização, os nanocristais precisam ser estabilizados por tensoativos. Esta estabilização é importante, pois a redução do diâmetro dos cristais aumenta significativamente a área superficial dos cristais, o que é termodinamicamente desfavorável. Desta forma, os nanocristais tendem a se aglomerarem. Esta aglomeração pode ser evitada ou minimizada por estabilização estérica e/ou por carga utilizando polímeros e/ou tensoativos como, por exemplo, o Pluronic e a Quitosana (Cerdeira et al., 2010).

Em doenças do trato urinário, algumas estratégias, utilizando sistemas de liberação sustentada, já foram estudadas no encapsulamento, principalmente, de quimioterápicos em diferentes nanoestruturas como, por exemplo, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas e dendrímeros. (Chen et al., 2011). Tyagi et al. (2004) estudaram os efeitos *in vivo* da capsaicina em capsulado em lipossomas para tratamento de cistites intersticiais. Neste estudo foi verificado que a formulação de lipossomas bloqueou

completamente o reflexo de micção hiperativo na bexiga, comparado ao efeito obtido por instilação com etanol 30%, mas sem quaisquer efeitos adversos no urotélio.

Quimioterápicos, como doxorrubicina (Subedi, et al., 2009), etoposido (Reddy et al., 2005) e docetaxel (Xu et al., 2009) foram encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas apresentando grandes vantagens como, por exemplo, solubilização destes fármacos em solução aquosa, aumento da estabilidade das formulações e liberação prolongada dos fármacos. Em nanopartículas poliméricas, Chang et al. (2009) estudaram o potencial de nanopartículas poliméricas preparadas com o polímero poli (etil-2-cianoacrilato) (PAEC) no encapsulamento de epirubicina. Neste estudo foi observado que as partículas apresentam alta adesão no urotélio e melhorou a penetração de epirubicina na parede da bexiga em relação ao fármaco livre demonstrando o grande potencial destas partículas no carreamento de fármacos para o tratamento de CB.

### **1.3 Nanopartículas mucoadesivas**

Uma das barreiras a ser superar na administração de fármacos é o aumento da adesão dos mesmos no local de ação como, por exemplo, na pele e em mucosas, aumentando assim a eficácia da terapia. Nesta linha nanopartículas preparadas com polímeros com propriedade mucoadesiva tem sido investigadas como, por exemplo, quitosana, ácido hialurônico, polietilenoglicol, alginato, gelatina entre outros (Muagbe et al., 2012).

A quitosana é um copolímero constituído por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis. Este composto é tipicamente obtido pela desacetilação da quitina que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (Silva et al., 2006).

Quitosana e quitina, bem como derivados da quitosana, são empregados em diversas áreas, como na agricultura, alimentícia, farmacêutica e cosmética (Silva et al., 2006). Na área farmacêutica, quitosana tem sido largamente utilizada em sistemas de transporte de fármacos (Ridolfi e col., 2012, Lira et al., 2007). Além de ser um polímero biocompatível, biodegradável, atóxico e de baixo custo, a quitosana possui propriedades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, aceleração do processo de cicatrização e apresenta propriedades de mucoadesão (Khoushab & Yamabhai, 2010). Devido às cargas positivas em pH fisiológico (grupos amino protonados) a quitosana tem a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente como pele e mucosas, como o urotélio, aumentando a retenção do fármaco no

local de aplicação (Muagbe et al., 2012, Berger et al., 2004) (Jordan et al., 2007, Eroglu et al., 2002).

A parede da bexiga tem uma espessura de 200  $\mu\text{m}$  de urotélio não-perfusado que é revestido com uma camada de mucina que é um glicosaminoglicano com carga altamente negativa. Desta forma, polímeros com carga positiva, como a quitosana, possuem alta adesão nesta camada além de aumentar a permeabilidade do epitélio (Muagbe et al., 2012). Burjak et al. (2001) observaram que microesferas de quitosana apresentaram alta adesão no urotélio sendo que esta adesão foi maior quando quitosana de baixo peso molecular foi utilizada. Bilensoy et al. (2009) verificaram in vitro que nanopartículas de policaprolactona (PCL) recobertas com quitosana se aderiram mais a células tumorais do que a células sadias demonstrando o grande potencial do uso de quitosana no transporte de fármacos aumentando o tempo de residência do fármaco na bexiga e direcionado-as as células tumorais.

Outro exemplo promissor de nanomateriais poliméricos é o Pluronic sendo este constituído por blocos poliméricos formados por uma porção hidrofílica (óxido de polietileno (PEO)) e uma porção hidrofóbica (óxido de polipropileno (PPO)), que estão arrançados em uma tripla estrutura formada por PEO-PPO-PEO, sendo que a porção hidrofóbica do polímero pode incorporar fármacos aumentando a solubilidade dos mesmos. Variações no número de PEO e PPO são caracterizadas por diferente balanço hidrófilo-lipófilo (HLB); (Batrakova & Kabanov, 2008). Essas unidades monoméricas se arranjam de forma a promover a formação de micelas, cujas propriedades de solubilidade estão estritamente relacionadas às propriedades do meio onde estas estão incorporadas (Adams et al., 2003; Batrakova & Kabanov, 2008).

Micelas poliméricas tem sido utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos encontrando ampla aplicação como (i) sistema de solubilização de fármacos insolúveis em meio aquoso, (ii) na estabilidade de fármacos e formulações farmacêuticas, (iii) como sistema de liberação controlada de fármacos, e (iv) como agente seletivo e específico de liberação programada de fármacos em locais previamente determinados (Adams et al., 2003; Batrakova & Kabanov, 2008). Tais propriedades fornecem a seletividade, especificidade e segurança necessária para o emprego destes agentes na indústria farmacêutica (Adams et al., 2003). As micelas poliméricas distinguem-se de outros carreadores de fármacos e compostos químicos, pois têm tamanho menor quando comparadas aos lipossomas e micropartículas. As moléculas poliméricas formadas por óxido de polietileno (poly – ethylene oxide – PEO) já são aprovadas pela FDA para a administração parenteral de fármacos.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1- Caracterizações das micro e nanopartículas com P-MAPA**

#### **2.1.1 Nanonização dos microcristais de P-MAPA**

Levando em consideração que a solubilidade do P-MAPA em soluções aquosas é baixa foi necessário estudar uma redução de seu tamanho. Assim, a redução dos grandes cristais de P-MAPA ( $> 200 \mu\text{m}$ ) para escala nanométrica ( $< 1 \mu\text{m}$ ) e estabilização com biopolímeros com propriedades mucoadesivas poderia melhorar a eficácia desse fármaco. Como estratégias de estabilização dos nanocristais de P-MAPA foi proposto no presente projeto o uso do Pluronic F68 e da Quitosana.

A nanonização dos microcristais de P-MAPA foram realizadas utilizando o processador ultrassônico de 750 Watt (VCX 750 – Sonics). Para isto, 5 mg do imunomodulador P-MAPA foram dispersos ou em 5 mL de solução aquosa de Pluronic F68 (5% m/v) (Aldrich) ou em 5 mL de uma solução de Quitosana (0,2%) (105 kDa / ~81% acetilação, Polymar), que foram utilizados como estabilizante dos cristais. Em seguida, esta dispersão foi sonicada no processador ultrassônico em ciclos de 10 minutos por até 1h e 40 minutos em banho de gelo. A cada ciclo de sonicação a temperatura da dispersão foi verificada mantendo-a abaixo de 20°C durante todo o processo de nanonização.

#### **2.2.2 Caracterização Morfológica dos cristais**

Os nanocristais foram caracterizados quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma pequena quantidade da dispersão dos nanocristais foi adicionada em uma fita de carbono fixada em um porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada – 10nm - sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV, utilizando-se uma tensão de aceleração de 20 kV.

### **2.1.3 Tamanho médio, distribuição de tamanho das partículas e Potencial Zeta**

O diâmetro médio dos nanocristais foi determinado através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons utilizando o aparelho Zeta Sizer Malvern. Para isto 1 mL de amostra diluída em água deionizada (1:10) foi adicionado em uma cubeta de acrílico e as medidas realizadas no Zeta Sizer da Malvern. A carga superficial dos nanocristais, potencial zeta ou mobilidade eletroforética, e a titulação de pH foi analisada pelo mesmo aparelho. Para estas análises a dispersão dos nanocristais foram diluídos 10x com uma solução de KCl 1 mM e o potencial zeta foi medido.

### **2.1.4 Estudo da influência do pH no diâmetro das nanopartículas**

Um estudo da influência do pH no diâmetro das partículas foi realizado utilizando um titulador MTP-2 Multi Purpose Titrator (Malvern®) acoplado ao Zeta Sizer Malvern. Soluções titulantes de NaOH (0,25 e 1M) e de HCl (1 M) foram utilizadas nestes experimentos. Neste estudo o pH foi variado de 6 a 9 e o diâmetro foi medido a cada variação de 0,5 no pH.

### **2.1.5 Raio X de Difração**

A análise estrutural do P-MAPA e das formulações com Pluronic F68 e Quitosana foi realizada por difração de raio X (DRX) utilizando o equipamento da marca Shimadzu, modelo XRD 7000, com varredura de  $2\theta$  na faixa de  $2^\circ$  a  $90^\circ$ , com radiação  $\text{CuK}\alpha$  1,54 Å, potência no tubo de 40 kV e corrente de 30 mA.

### **2.1.6 Liofilização das nanopartículas**

Para secagem das nanopartículas, estas foram congeladas em gelo seco/etanol e liofilizadas em um Liofilizador Terroni LB 300TT por 48 horas. Para amenizar a agregação das partículas nanonizadas com Quitosana, antes do congelamento das mesmas foi adicionado um crioprotetor. O crioprotetor estudado fora o manitol na porcentagem de 20%(m/v).

### 2.1.7 Caracterização Termofísica por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Experimentos foram realizados para determinar as possíveis interações entre o Pluronic F-68 e a Quitosana com o fármaco em estudo P-MAPA. Os termogramas de DSC foram obtidos por um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-Q10 (TA Instruments). Aproximadamente 3 mg de cada amostra foi aquecida usando um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 10 a 160 °C na taxa de aquecimento de 5°C/min.

### 2.1.8 Raio X de Fluorescência

Para analisar as intensidades fluorescentes dos elementos possivelmente presentes no P-MAPA utilizou-se um Espectrômetro Sequencial de Fluorescência de Raios-X por Dispersão de Comprimento de Onda Shimadzu Modelo XRF. Os elementos analisados foram Fósforo (P), Magnésio (Mg), Potássio (K), Cálcio (Ca), Manganês (Mn), Cromo (Cr) e Ferro (Fe). As condições de análise foram:

- Atmosfera: vácuo
- Rotação da amostra: sim
- Fonte de radiação: Ródio
- Voltagem: 40kV
- Corrente: 95mA
- Modo: contínuo
- Velocidade: 8 °/min
- Step: 0.01°
- Canais de aquisição:
  - Ti-U => Cristal de difração: LiF, detector SC
  - K,Ca, Sn-Cs => Cristal de difração: LiF, detector FPC
  - Mg => Cristal de difração: TAP, detector FPC
  - P => Cristal de difração: Ge, detector FPC

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1- Caracterizações das micro e nanopartículas com P-MAPA: MEV, Titulação, tamanho e potencial Zeta

Nanocristais do imunomodulador P-MAPA com diâmetro abaixo de 500 nm foram obtidos após o processo de nanonização como demonstrado na **Tabela 1**. A carga superficial dos nanocristais foi dependente do estabilizante utilizado no processo de nanonização. A carga de superficial das nanopartículas demonstra a carga eletrostática superficial destas e pode resultar da dissociação de grupos funcionais na superfície da nanopartícula, ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso do sistema.

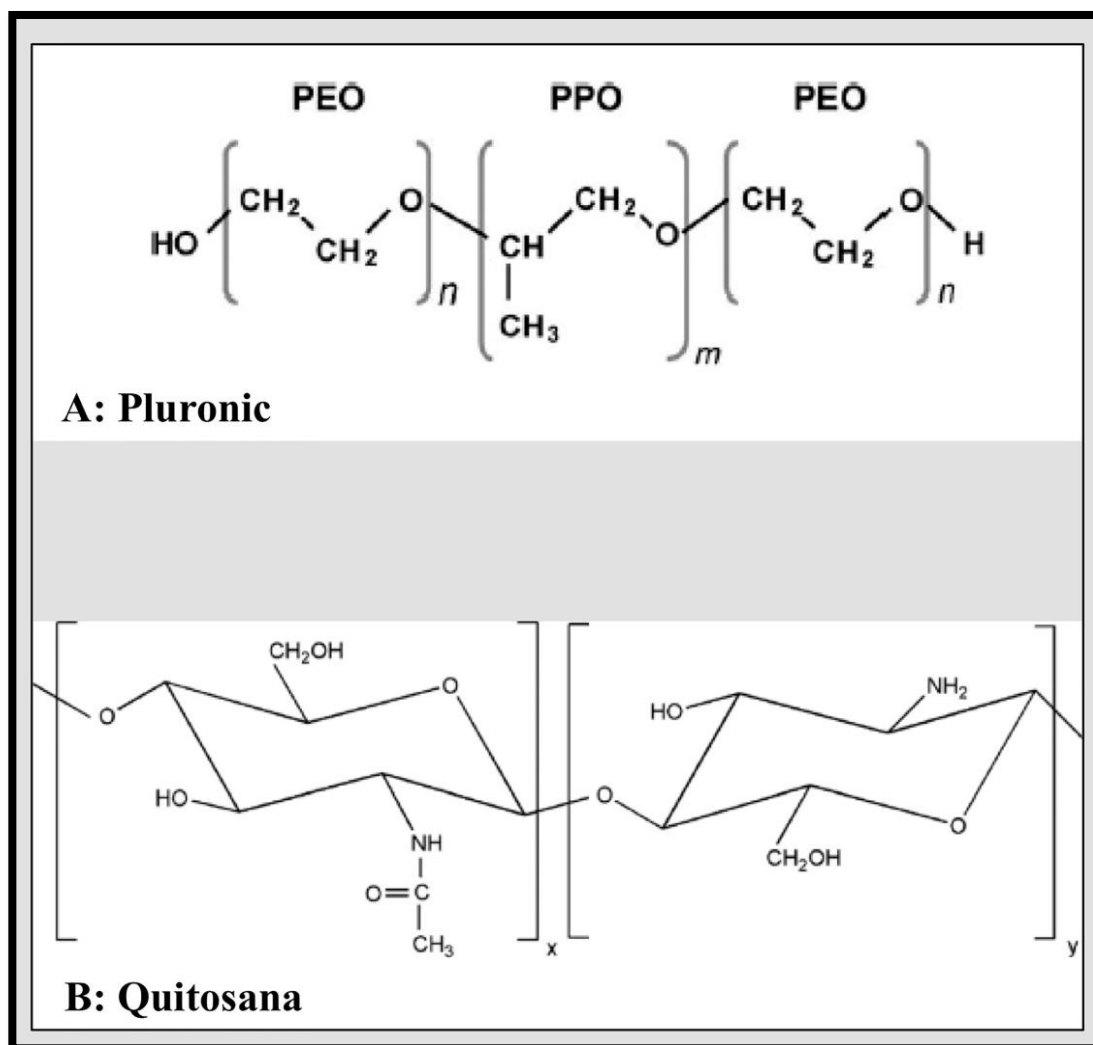
(Magenheim e Benita, 1991; Mosqueira et al., 2000).

Nanocristais com carga superficial negativa foram obtidos quando se utilizou o estabilizante Pluronic e com carga positiva quando se utilizou a quitosana como agente estabilizante. Esta diferença na carga pode ser explicada pelas estruturas dos estabilizantes (**Figura 3**). No caso do Pluronic, este apresenta vários grupos -OH e -C-O-C- (**Figura 3A**) que conferem a esta estrutura várias regiões com densidade de carga negativa ( $\delta^-$ ) enquanto que no caso da quitosana os grupamentos amino ( $\text{NH}_2$ ) se encontram protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) (**Figura 3B**), em pH abaixo de 6,5, conferindo desta forma, várias regiões com carga positiva. Desta forma, foi possível obter nanocristais com diferentes cargas superficiais.

O diâmetro médio e o índice de polidispersidade dos cristais nas duas formulações foram muito próximos, sendo que este é um parâmetro que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos da partícula na formulação.

**Tabela 1:** Valores de pH, diâmetro e potencial zeta dos nanocristais do imunomodulador P-MAPA.

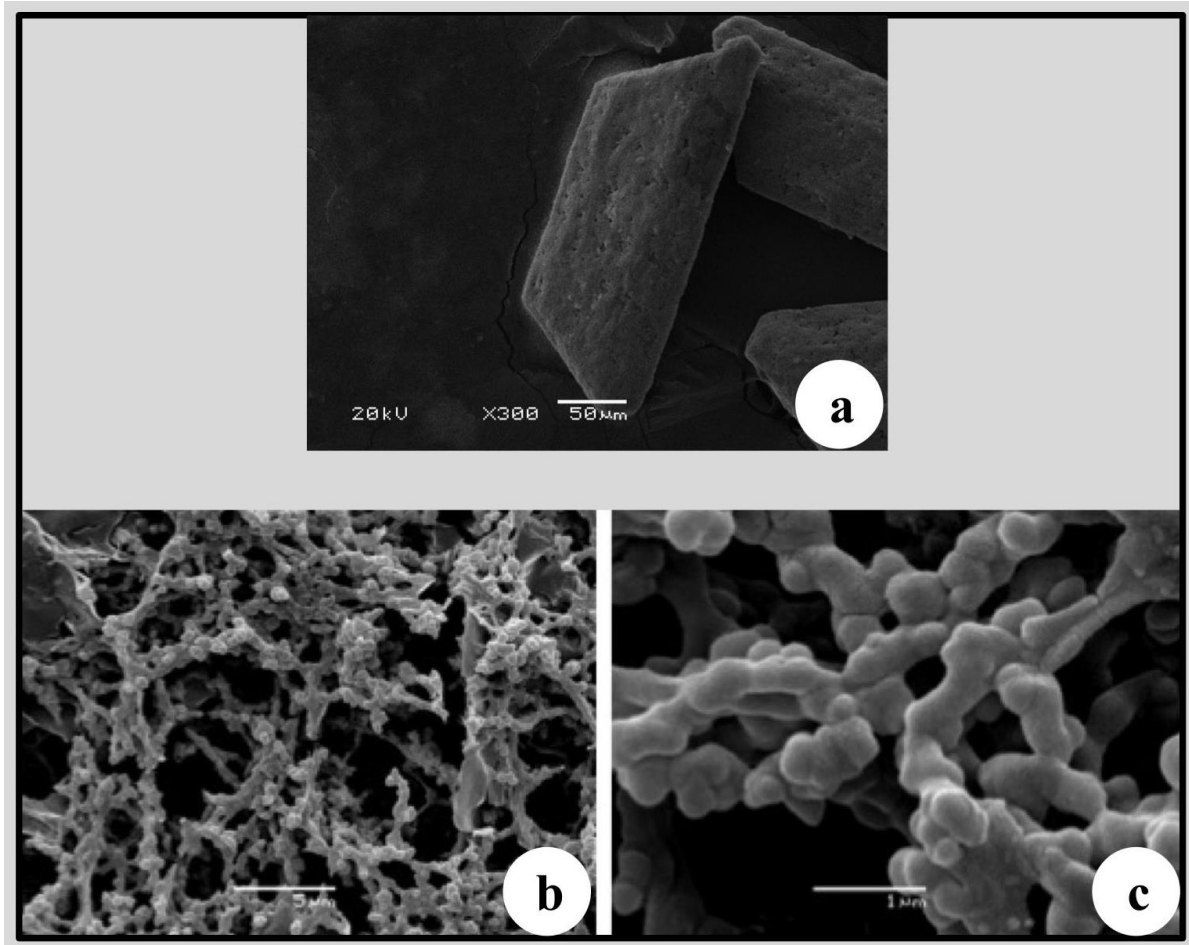
| Amostra          | pH  | Diâmetro (nm) | Índice de Polidispersidade (PDI) | Potencial Zeta (mV) |
|------------------|-----|---------------|----------------------------------|---------------------|
| P-MAPA-Pluronic  | 6,5 | 497           | 0,541                            | - 14                |
| P-MAPA-Quitosana | 5,0 | 462           | 0,573                            | + 23                |



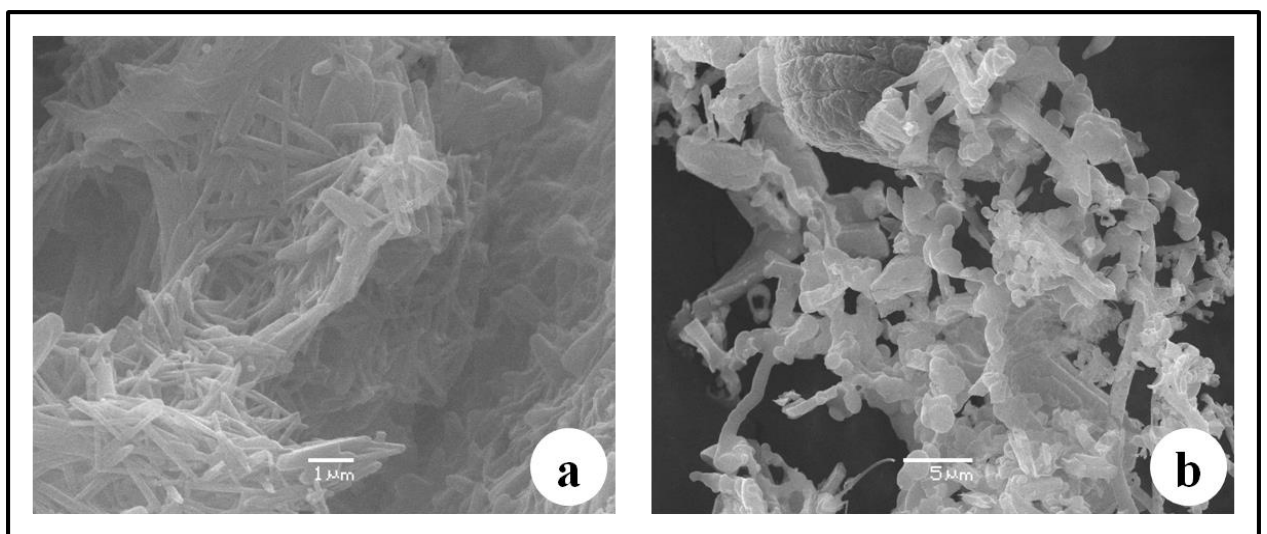
**Figura 3:** Estrutura dos estabilizantes, A: Pluronic, B: Quitosana.

Com relação a morfologia dos micro e nanocristais de P-MAPA, o diâmetro dos microcristais de P-MAPA variou entre 200 – 400  $\mu\text{m}$  (**Figura 4a**) mostrando uma estrutura com um grau de cristalinidade muito elevada apresentando uma morfologia ortorrômbica.

A morfologia dos nanocristais de P-MAPA estabilizados por Pluronic e Quitosana foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figuras 4b, 4c, Figuras 5a, 4c**). Nestas imagens observaram-se estruturas nanométricas (400-700 nm) dos cristais que foram aglomeradas devido ao processo de secagem necessário para a realização das imagens, e devido a presença de grande quantidade do estabilizante Pluronic e Quitosana que, provavelmente, estava revestindo os cristais.



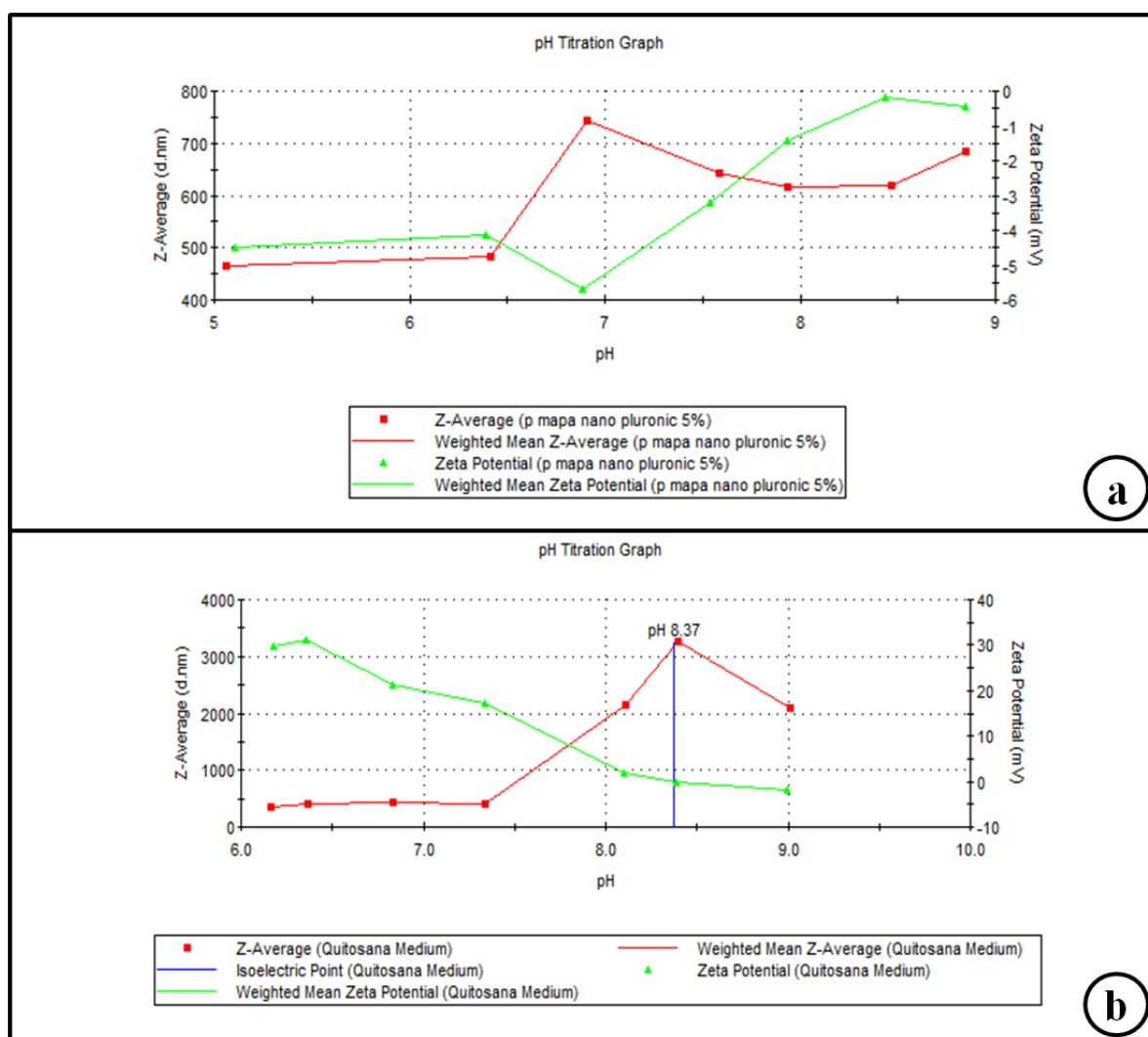
**Figura 4:** (a) Micrografia dos microcristais de P-MAPA; (b), (c) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos nanocristais de P-MAPA estabilizados com Pluronic.



**Figura 5:** (a) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos nanocristais de P-MAPA estabilizados com Quitosana; (b) Microscopia Eletrônica de Varredura do nanocristal de P-MAPA puro.

Na titulação de pH, o estabilizante Pluronic F68 apresentou-se mais estável em relação a variação de pH quando comparado com a quitosana (**Gráfico 1**). Observou-se que o tamanho das partículas de P-MAPA estabilizado com Pluronic não foi alterado em pH básico (pH 8 - 9) (**Gráfico 1a**), onde o mesmo permaneceu em escala nanométrica. Em contraste, o tamanho das partículas de P-MAPA estabilizado com quitosana não permaneceu em escala nanométrica, sendo que seu tamanho foi aumentando a medida que o pH se tornava mais básico (**Gráfico 1b**).

**Gráfico 1:** Titulação de pH e seu efeito sobre o diâmetro médio dos nanocristais de P-MAPA estabilizados com Pluronic F68 (a) e Quitosana (b).



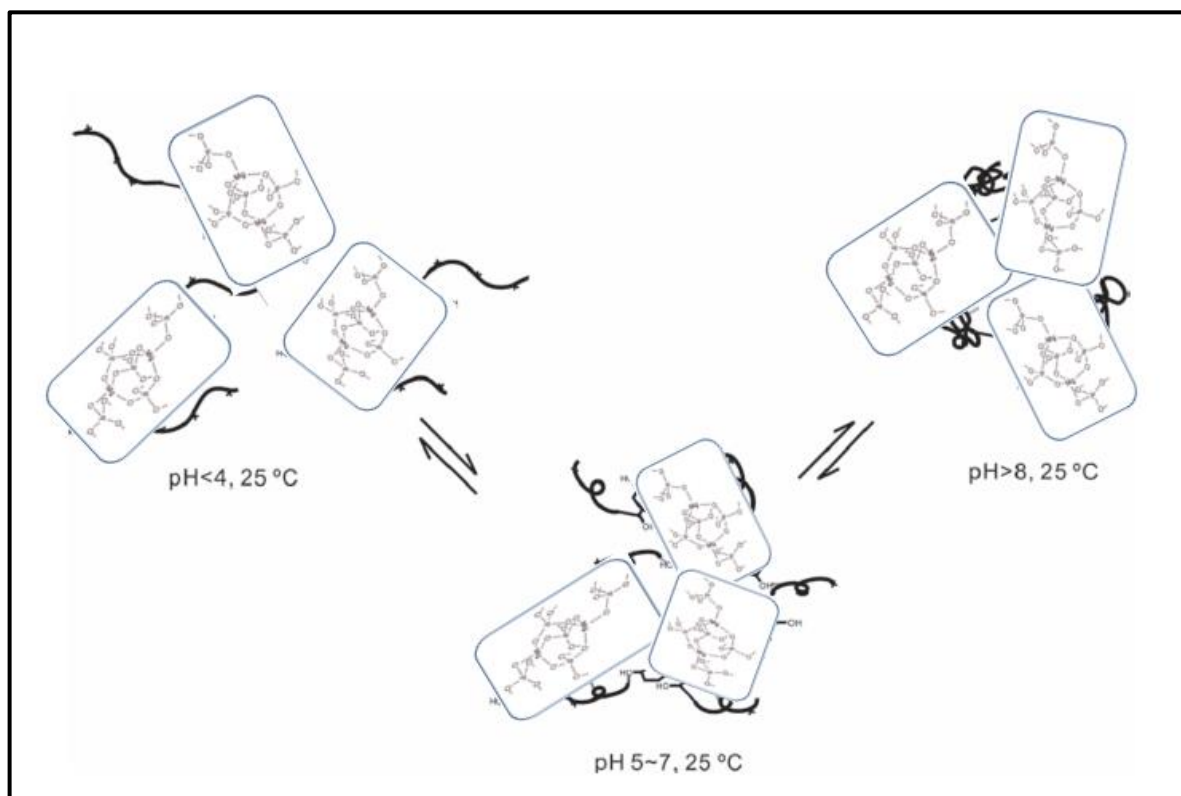
Dados do nosso grupo de pesquisa indicam que o ambiente apresentado pela bexiga urinária com CB apresenta pH básico, sendo que o pH ideal para que a quitosana mantenha seus grupamentos amino protonados é abaixo de 6,5, ou seja, um meio ácido fraco. O ambiente

básico da urina altera a estrutura da quitosana tornando-a insolúvel, acarretando a desprotonação de seus grupamentos aminos e consequente precipitação da mesma. Dessa forma, o P-MAPA não consegue aderir-se ao urotélio da bexiga urinária uma vez que a quitosana, que já apresenta baixa área superficial, limita ainda mais o acesso aos sítios de adsorção (grupos amino) não expostos, diminuindo a velocidade e a capacidade de adsorção do urotélio. Tais desvantagens foram corroboradas por Dias et al. (2008). Cabe ressaltar que devido a alteração da estrutura da quitosana, o P-MAPA nanonizado também sofreu alterações no tamanho de partícula reagregando-se e, dessa forma, tomando proporções micrométricas. Este indício pode ser importante para propormos que a utilização da quitosana, sem prévia modificação química estrutural, oferece uma limitação em sua utilização como carreadora de fármacos.

Na literatura já é reportado que a velocidade de liberação de fármacos a partir de matrizes de quitosana é afetada pela mudança do pH (Laranjeira & Fávere, 2009) e algumas aplicações farmacêuticas da quitosana também podem ser limitadas por problemas de hidrossolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água e em meio neutro, condições em que diversas enzimas fisiológicas exercem suas atividades (Kubota et al., 2000). Silva et al., (2006), sugeriram que a medida que o polímero é catiônico, este se encontra solúvel por exemplo, no estômago (faixa de pH 1- 3), porém, pode precipitar no intestino (pH 6,5). Esses mesmos autores destacaram que esta característica físico-química é o ponto chave no “mecanismo de ação” da quitosana, onde devido à precipitação, o complexo carregado pela mesma não é absorvido.

O valor do potencial zeta do P-MAPA nanonizado com quitosana é positivo no pH 6, porém este decresce quando o pH se torna neutro ou básico, o que reflete a desprotonação dos grupamentos terminais da quitosana, indicando que as cargas eletroestáticas na superfície coloidal foram eliminadas. Este efeito pode ser esquematicamente ilustrado (**Figura 6**). Com o pH abaixo de 6, os grupos aminos da quitosana estão totalmente protonados e a formulação nanoestruturada de P-MAPA com quitosana fica individualmente dispersa em água devido à forte repulsão eletrostática. O aumento do tamanho pode-se explicar devido aos terminais da quitosana que estão estendidas e semirrígidas na estrutura. Com o pH em aproximadamente 7,5 a maioria dos segmentos da quitosana estão desprotonadas e as repulsões internas da macromolécula decresce, resultando no enrolamento das cadeias da quitosana. Entretanto, as forças Coulombicas residuais prevalecem nas ligações de hidrogênios entre os domínios de P-MAPA e quitosana, prevenindo a formação de agregados maiores, o que explica a manutenção dos tamanhos nessa faixa de pH. Com pH acima 7,5 aparentemente começa a neutralizar a

estrutura da formulação P-MAPA-quitosana e gradualmente começa a agregação e precipitação devido a associação hidrofóbica e a forte interação ligante com hidrogênio. Efeitos similares foram encontrados com oxido grafeno e quitosana (Bao et al., 2011).



**Figura 6:** Esquema da desprotonação dos grupamentos animos terminais da quitosana.

Em relação a Quitosana, pode-se afirmar que o pH básico da urina na bexiga urinária leva à desprotonação e precipitação da quitosana, o que dificulta a adesão e ação do P-MAPA no urotélio, resultando em baixa efetividade desse fármaco no tratamento intravesical do CBNMI. Portanto, a avaliação do pH do meio é fundamental para a aplicação de formulações contendo quitosana.

### 3.2- Comparação das formulações de P-MAPA com Pluronic F68 através das análises de Raio X de Fluorescência (XRF), Difração de Raio X (XRD) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica espectroscopia de fluorescência de raios-X (XRF) é uma técnica analítica bem estabelecida para determinar a composição química de uma amostra (Young et al., 2016) e, com a utilização desta técnica podemos analisar que a razão de P/Mg nas amostras originais

de P-MAPA está ao redor de 1.5-1.8. Neste caso P-MAPA \_P17 apresenta um valor de 1.4. Contudo é pertinente lembrar que o erro destas medidas de fluorescência de raios- X está ao redor de 25-30%. Logo teríamos um valor de P/Mg de 1.8, sendo este um valor dentro das amostras padrões do P-MAPA (**Figura 7**).

| Sample : P-MAPA_P17               |           |           |       |          |        |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-------|----------|--------|
| Operator:                         |           |           |       |          |        |
| Comment : Ana Cláudia             |           |           |       |          |        |
| Group : [Qual-Quant.]DURAN_Mg e K |           |           |       |          |        |
| Date : 2013-07-26 15:50           |           |           |       |          |        |
| [Quantitative Result]             |           |           |       |          |        |
| Analyte                           | Result    | Proc-Calc | Line  | Net Int. | BG Int |
| P                                 | 14.9900 % | Quant.-FP | P Ka  | 34.888   | 0.436  |
| Mg                                | 10.7723 % | Quant.-FP | MgKa  | 2.861    | 0.007  |
| K                                 | 1.3813 %  | Quant.-FP | K Ka  | 2.442    | 0.015  |
| Ca                                | 0.1491 %  | Quant.-FP | CaKa  | 0.228    | 0.009  |
| Mn                                | 0.0855 %  | Quant.-FP | MnKa  | 0.180    | 0.013  |
| Cr                                | 0.0146 %  | Quant.-FP | CrKa  | 0.025    | 0.008  |
| Fe                                | 0.0100 %  | Quant.-FP | FeKa  | 0.036    | 0.019  |
| C326H614O163N204S2                | 72.5972 % | Balance   | ----- | -----    | -----  |

**Figura 7:** Raio X de Fluorescência do P-MAPA.

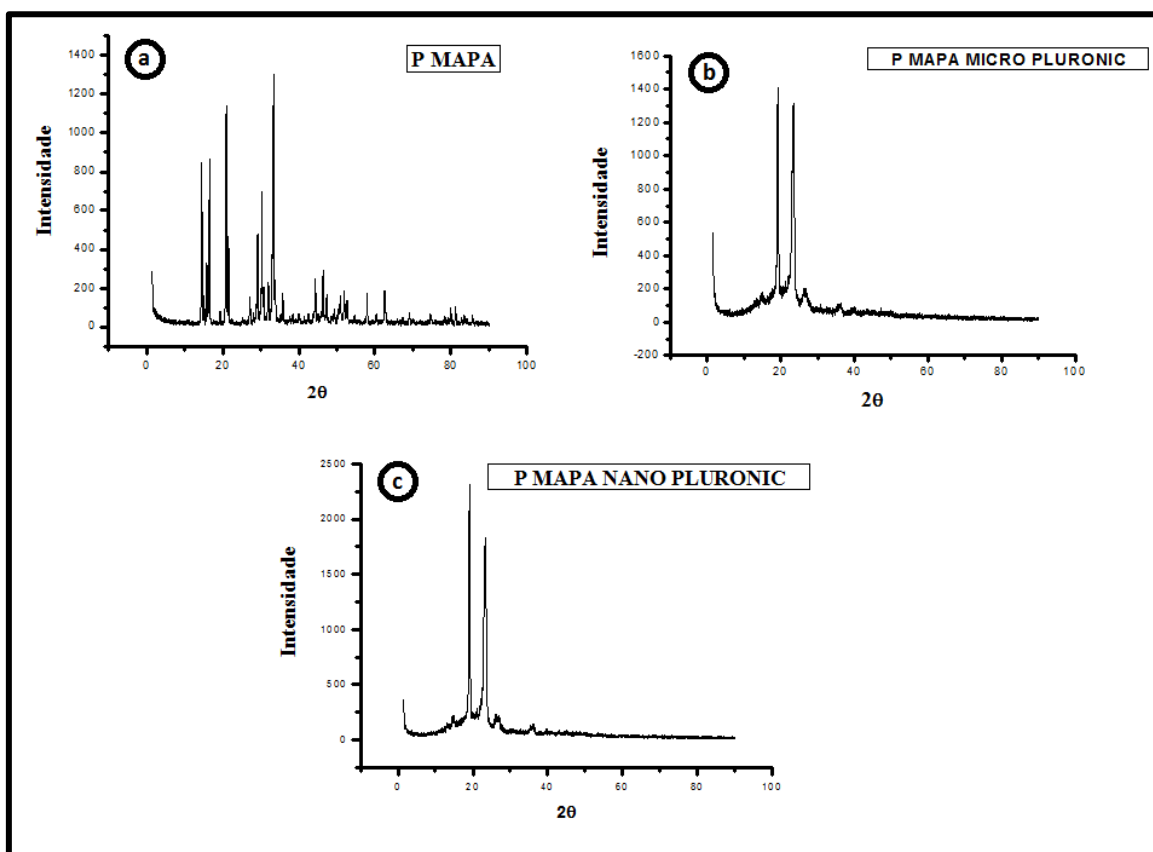
Através das análises de Raio X de Difração (**Figuras 8, 9**) e Calorimetria Diferencial de Varredura das misturas de Pluronic F-68 (5, 3 e 1,5%) e P-MAPA (**Figuras 10, 11a, 12 e 13a**) observamos que, pela alta da concentração de Pluronic, os refratogramas e os termogramas foram mascarados pelos sinais referentes ao Pluronic F-68.

A técnica de difração de raios-X (XRD) é uma técnica fundamental para a caracterização de estruturas cristalinas, fornecendo evidências da estrutura em várias dimensões (Schlögl, 2009) e isto é possível porque os comprimentos de onda dos raios-X possuem dimensões espaciais semelhantes às distâncias entre os planos atômicos dos sólidos cristalinos sendo assim, quando um feixe de raios-X se choca com um sólido cristalino, o mesmo interage com os átomos presentes e podem produzir picos reforçados de radiação, de diversas intensidades. (Massa, 2004), ocorrendo conforme a Lei de Bragg ( $n \lambda = 2 d \sin(\theta)$ ) a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram.

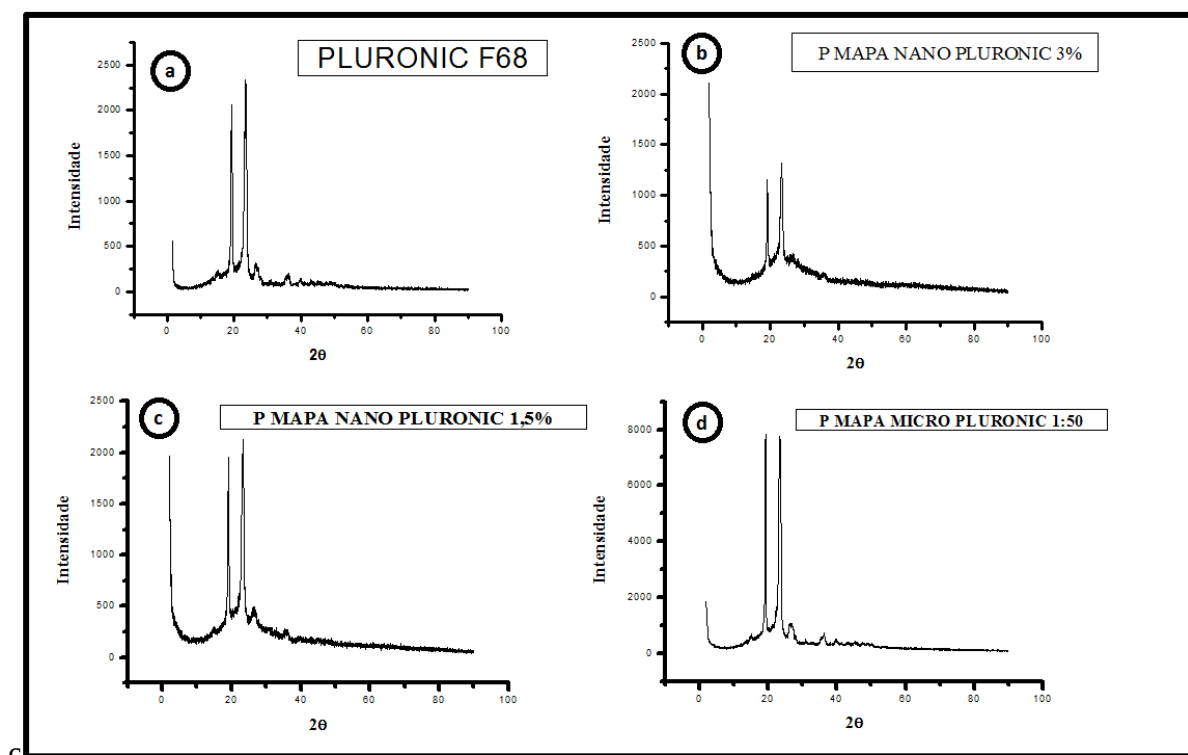
Nossos resultados indicaram menos propriedades cristalinas do fármaco ou o fármaco poderia ser encontrada no estado de solução sólida a baixa concentração do carreador, o que

fora observado pela análise da mistura física de P-MAPA na proporção 8:2 em relação ao Pluronic F68 (**Figura 13b, e Figura 14**).

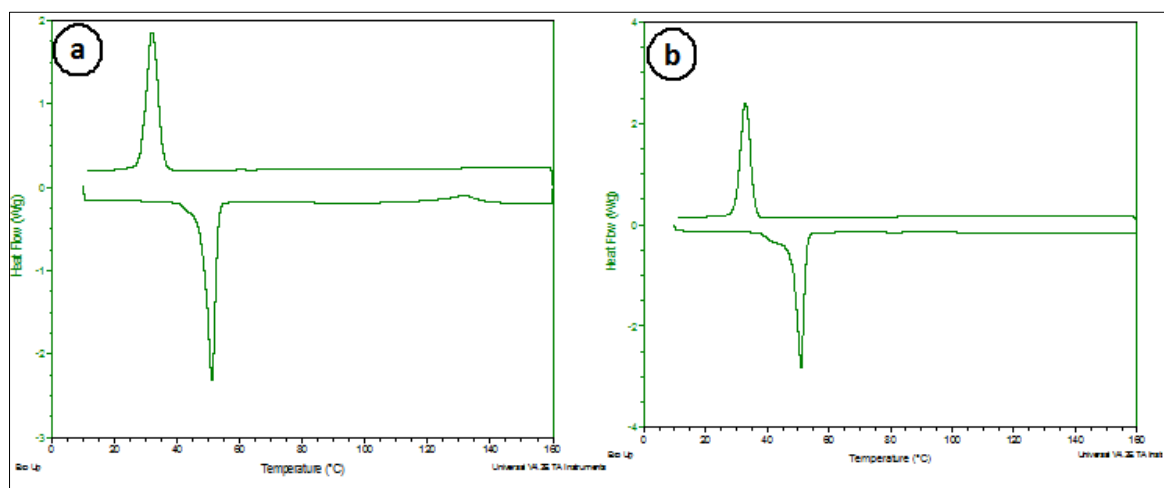
Entretanto, quando analisados separadamente o P-MAPA foi altamente cristalino com picos de difração característicos (**Figura 8a**) apresentando picos de difração ( $2\theta$ ) a 15,77, 20,84, 21,43, 27,06, 30,62, 31,88, 33,27, e 33,67 que podem ser correlacionados com índices (hkl) (002), (111), (012), (103), (211), (004), (022), e (212) respectivamente dos cristais de hexagonais de amônio magnésio fosfato. As diferenças em algumas reflexões provavelmente são de orientações peculiares da presença de produtos orgânicos (lipídeos e proteínas). O Pluronic F68 também mostrou seus picos característicos de alta intensidade a valores de  $2\theta$  de 19,13 e 23,24° (**Figura 9a**).



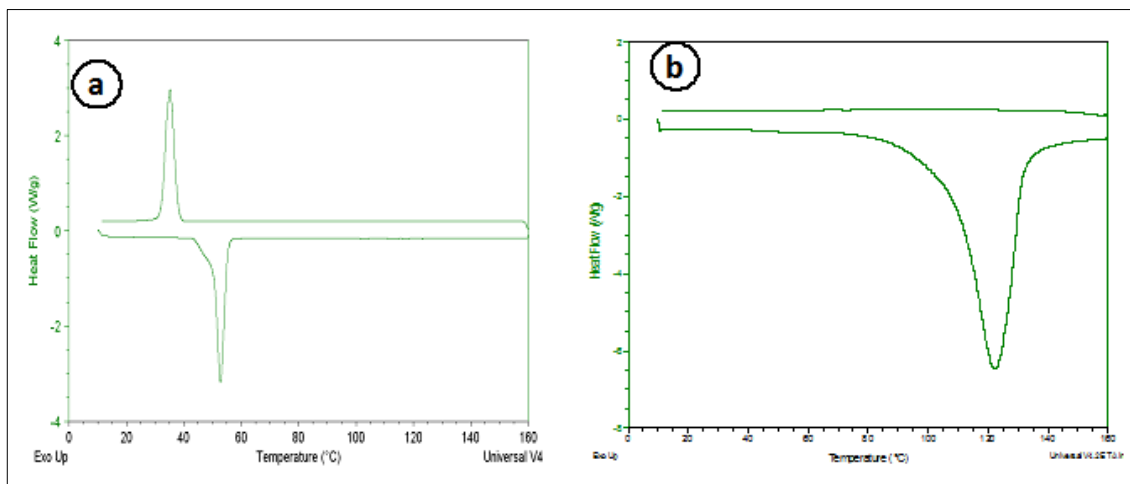
**Figura 8:** Difratoograma do P-MAPA (a), da formulação de P-MAPA em tamanho micrométrico com Pluronic F68 (5%) (b) e da formulação de P-MAPA em tamanho nanométrico com Pluronic F68 (5%) (c).



**Figura 9:** Difratoograma do estabilizante Pluronic F68 (a), da formulação P-MAPA nanonizado com Pluronic F68 (3%) (b), da formulação P-MAPA nanonizado com Pluronic F68 (1,5%) (c), da mistura física de P-MAPA tamanho micrométrico com Pluronic F68 (1:50).



**Figura 10:** Termograma do P-MAPA em tamanho micrométrico em solução de Pluronic F68 (5%) (a), e do P-MAPA em tamanho nanométrico em solução de Pluronic F68 (5%) (b).

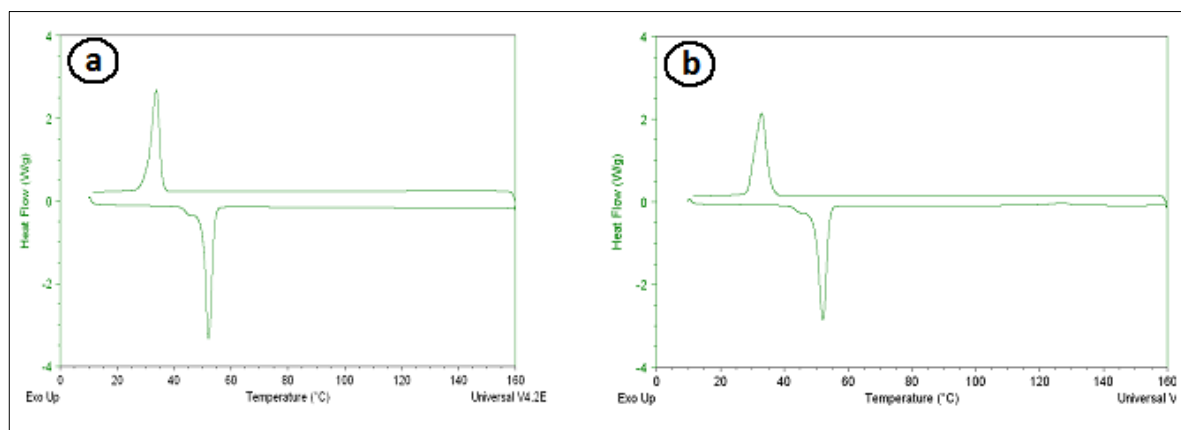


**Figura 11:** Termograma do Pluronic F68 (a), e do P-MAPA microcristal puro (b).

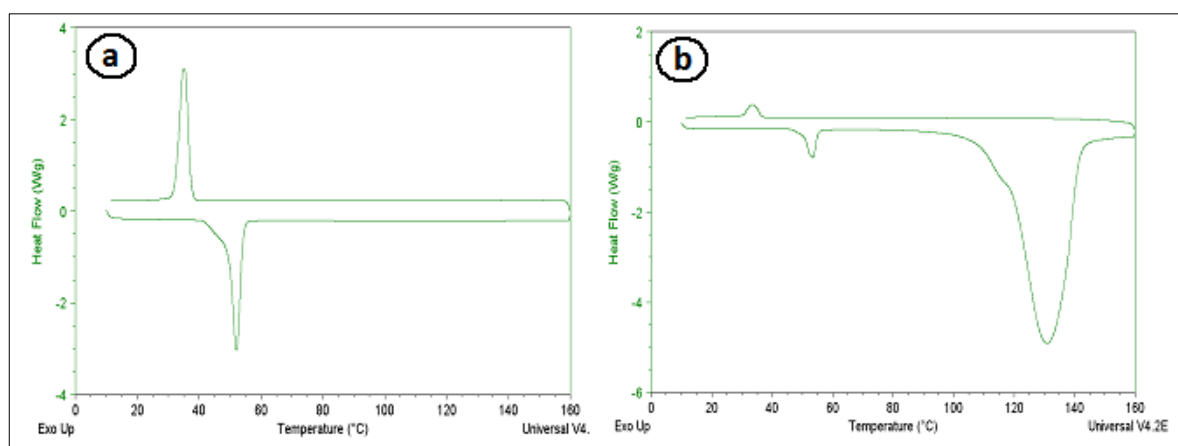
Para avaliar a interação entre o P MAPA e os carreadores nas formulação foram feitas análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Esta é uma técnica na qual o fluxo de calor (energia) passa para a amostra e é monitorado em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, numa atmosfera específica, é programada (Groenewoud, 2001).

Esta técnica por si só não pode proporcionar informação direta sobre a amostra à nível molecular, porém quando acoplada a outras ferramentas, tais como difração de raios-X, e correlacionada com estudos fisiológicos, este método fácil e rápido, por vezes, é capaz de produzir informações que não poderiam ser obtidas por outras abordagens (Stein, 1974).

Neste estudo o termograma do P-MAPA microcristal puro (**Figura 11b**) mostra que a partir de 50°C pode ocorrer um processo endotérmico próprio de desnaturação de proteínas e de ácidos graxos. O termograma também apresenta um pico centrado ao redor de 122°C este pico pode ser atribuído a uma perda principalmente durante o aquecimento. A existência de somente um pico no DSC sugere que a perda de amônia e água no P-MAPA ocorre simultaneamente.



**Figura 12:** Termograma do P- MAPA em tamanho nanonizado em solução de Pluronic F68 (3%) (a), e do P- MAPA nanonizado em solução de Pluronic F68 (1,5%) (b).



**Figura 13:** Termograma do P-MAPA mistura física com Pluronic F 68 (1:50) (a), e P-MAPA em mistura física com Pluronic F68 (8:2) (b).

Estes resultados também foram observados por Fathy e colaboradores (2003) no preparo de dispersões sólidas contendo piroxicam e Pluronic.

Neste trabalho Fathy e colaboradores (2003) utilizaram preparações contendo piroxicam e cada copolímero em diferentes proporções de peso (1:1, 1:3 e 1:5 fármaco: polímero) foi empregado o método de evaporação de solvente. A droga foi dissolvida em cloreto de metileno e o copolímero em uma quantidade mínima de etanol. As duas soluções foram misturadas e os solventes orgânicos foram removidos por rotaevaporação à temperatura ambiente, com o auxílio de agitação suave. A massa seca foi pulverizada, peneirada e as frações de partículas com tamanhos entre 100-250  $\mu\text{m}$  foram utilizadas neste estudo. As misturas físicas de piroxicam e Pluronic em diferentes proporções foram preparadas como dispersões sólidas por mistura suave num almofariz para o fármaco e o copolímero. Neste caso, o piroxicam (PMX) foi altamente cristalino com picos de difração característicos.

O Pluronic 68 também mostrou seus picos característicos de alta intensidade a 19,13°C e 23,24°C. A intensidade dos picos do piroxicam (PXM) no caso de dispersão sólida (SD) (proporção de 1:1) foi menor que a da mistura física (PM) na mesma proporção.

Pelo aumento da concentração do Pluronic 68 os difratogramas destas preparações também foram completamente mascarados pelos sinais do Pluronic 68 assim como os resultados encontrados neste estudo. Os resultados de Fathy et al., (2003) indicaram menos propriedades cristalinas do fármaco ou o fármaco poderia ser encontrado no estado de solução sólida a baixa concentração.

Os termogramas de DSC do piroxicam apresentaram uma fusão endotérmica com ponto de fusão de 201,5°C. O ponto de fusão do Pluronic F-68 aparece a 51,8°C. Tanto a mistura física como a de dissolução exibiram picos endotérmicos agudos devido a fusão do Pluronic na mesma posição que o Pluronic F-68 sozinho (o ponto de fusão do piroxicam na mistura e na dissolução deslocou para 191,7°C). Isto revela a existência de Pluronic no estado cristalino que é consistente com o aparecimento do pico de difração padrão em Raio X de Difração (XRD). O ponto de fusão do piroxicam foi observado na mistura física e na dissolução na razão de 1:1 como endotermas largos e menores que o ponto de fusão do fármaco. Os picos de piroxicam (PXM) na dissolução preparada na razão 1:1, ocorreram a 191,7°C. O desaparecimento dos endotermas de fusão do piroxicam foram observados em todas as dispersões maiores na proporção de 1:1. Os resultados poderiam sugerir que o piroxicam (PXM) é menos cristalino ou está em sua forma amorfa.

Esta similaridade entre o DSC das dispersões sólidas e da mistura física indicam a ausência de interação química entre piroxicam e Pluronic F-68.

Yuasa *et al.* (1994) reportaram que a razão do desaparecimento dos picos endotérmicos na mistura física deu-se, provavelmente, por que o estado cristalino do fármaco foi levado ao estado amorfo devido ao aumento da mobilidade molecular durante o processo de aquecimento.

El Maghraby e Alomrani (2009), também observaram esses dados nas formulações com Pluronic e itraconazol onde o Pluronic F68 produziu um pico agudo endotérmico a 53,9°C. A formulação do itraconazol como coevaporado binário com o Pluronic F-68 reduziu significativamente a temperatura de seu pico endotérmico com picos mais largos comprados com itraconazol puro. A redução da temperatura e a largura dos picos aumentou com aumento da concentração de Pluronic F-68. Este comportamento pode ser explicado com base na formação de uma mistura eutética entre o fármaco e o Pluronic F-68. Explicação similar foi dada por Chen et al. (2004) na utilização do fármaco lipofílico ABT-963 com Pluronic F-68. Este efeito sugere que no aquecimento da mistura física (DSC) o fármaco interage

progressivamente com o Pluronic que funde a temperaturas mais baixas. Sugestão semelhante também foi registrada por Vippagunta et al. (2002) para a interação entre a nifedipina e o Pluronic F-68.

Outro exemplo também é reportado por Badawi et al., 2011 com diferentes sistemas de dispersões sólidas de ITZ (itraconazol). Plu (pluronic), Eud (eudragit). Apresentando picos de 166,2°C para ITZ, picos de 164,2°C para formulação ITZ + PLU 68 (1:1) sendo este pico reduzido e deslocado, picos de 153,06°C para formulação de ITZ + PLU 68 (1:3) apresentando um pico fraco e deslocado, pico de 163,29°C para a formulação ITZ+PLU 127 fraco e deslocado e pico de 156,83°C para a formulação de ITZ+PLU 127 (1:3) fraco e deslocado. Os resultados de Difração de Raio X foram iguais com Pluronic F-68 e Pluronic F-127. Porém só foram apresentados com Pluronic F-127.

A grande redução da intensidade do ITZ (itraconazol) endotérmico com o aumento da concentração de Pluronic poderia ser atribuído a redução na cristalinidade e/ou dissolução progressiva e completa da cristalinidade remanescente do ITZ (itraconazol) no Pluronic a temperatura abaixo de seu ponto de fusão durante o aquecimento no DSC. Isto foi confirmado utilizando o XRD que a dispersão sólida contendo baixa e alta proporção de Pluronic possui graus comparáveis da cristalinidade do ITZ.

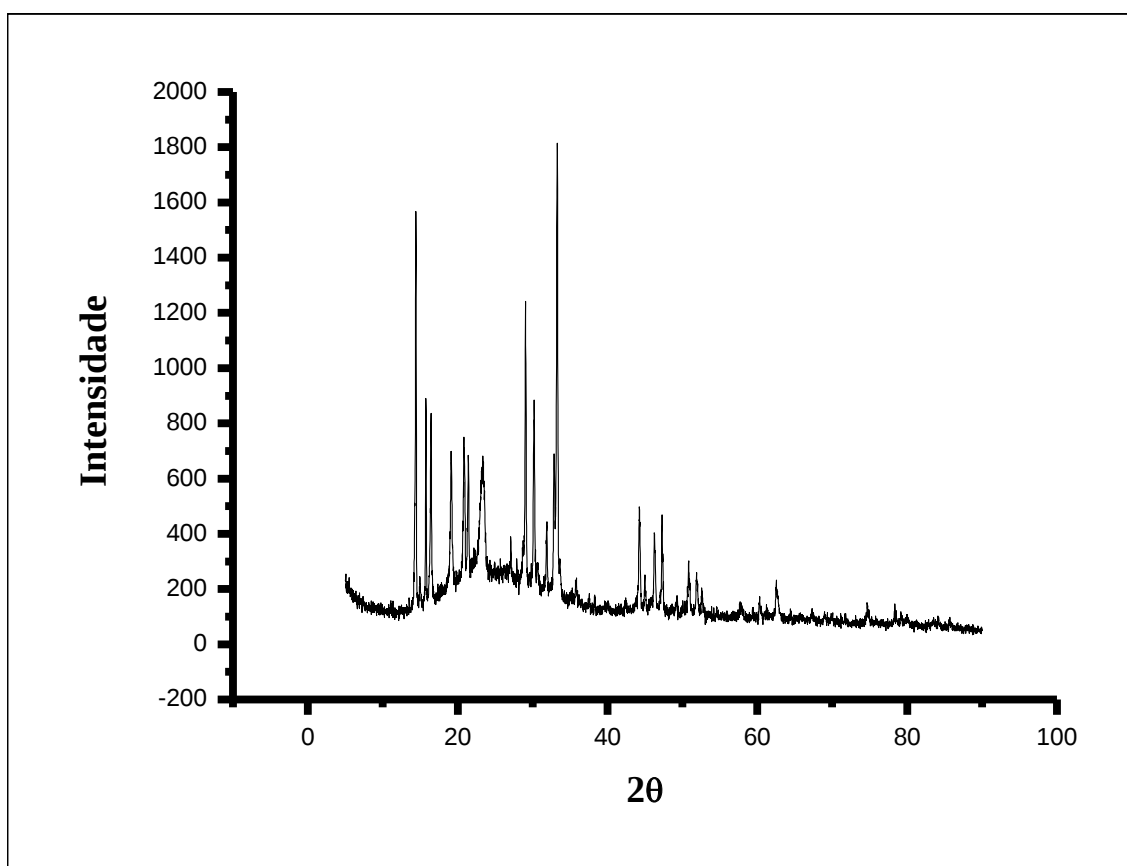
O deslocamento na posição do endoterma a temperaturas menores que o ponto de fusão do ITZ poderia ser explicado com base na formação de misturas eutéticas entre o ITZ e o Pluronic 68 ou 127. (Badawi *et al.*, 2011).

As figuras de DSC mostram que Pluronic F68 produz um pico agudo endotérmico a 53.9°C (**Figura 11a**). Formulação de P-MAPA como co-evaporado binário com Pluronic F68 reduz completamente o T<sub>m</sub> a ~120°C de seu pico endotérmico (**Figura 11b**). Este comportamento pode ser explicado com base na formação de uma mistura eutética entre o fármaco e Pluronic F68. Explicação similar foi dada entre o lipofílico ABT-963 com Pluronic F68 (Zhang et al., 2004). Este efeito sugere que no aquecimento da mistura física no DSC, o fármaco interage progressivamente com Pluronic que funde a temperaturas mais baixa. Sugestão similar foi registrada para a interação de nifedipina com Pluronic. (Vippagunta et al., 2002)

É sabido que o Pluronic em solução aquosa em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) (Pluronic F68, 24-32 mg/mL) (Moghimi et al., 2004), formam micelas de tamanho que variam de 10 nm a 100 nm e que podem ser utilizadas para solubilizar e melhorar o tempo de circulação de fármacos em nanomedicina (Liu et al., 2011). As micelas de

Pluronic consistem em blocos hidrofóbicos que funcionam como carreadores de vários compostos, principalmente fármacos insolúveis em água (Batrakova & Kabanov, 2008).

Entretanto, em nosso caso foram utilizadas as concentrações de 1,5% de Pluronic (15 mg/mL) e 3% (30 mg/mL). No primeiro caso não teria micelas e no segundo sim. Entretanto, não tivemos diferenças tanto no DSC ou XRD, já que estão em estado sólido (**Figura 9b, 9c, Figura 12a, 12b**). Contudo, através da análise de XRD da mistura física de P-MAPA numa proporção maior de P-MAPA em relação ao Pluronic F68 (8:2) foram observados os picos característicos do P-MAPA (**Figura 14**).



**Figura 15:** Difratograma da mistura física de P-MAPA tamanho micrométrico com Pluronic F68 (8:2).

Zhirnov et al. (2005) afirmaram que a interação Pluronic/célula também pode ser dependente do tipo de célula em estudo e essa distinção pode ser atribuída pela diferença na composição entre as membranas celulares. Os estudos de Kier (1990) e Sherbet (1989) demonstraram que membranas de células tumorais com alto potencial metastático tendem a apresentar uma menor proporção colesterol/fosfolípido, o que altera a microviscosidade da

membrana, tornando os componentes lipídicos mais móveis o que auxilia na formação de uma cavidade suficiente para acomodar uma cadeia de Pluronic.

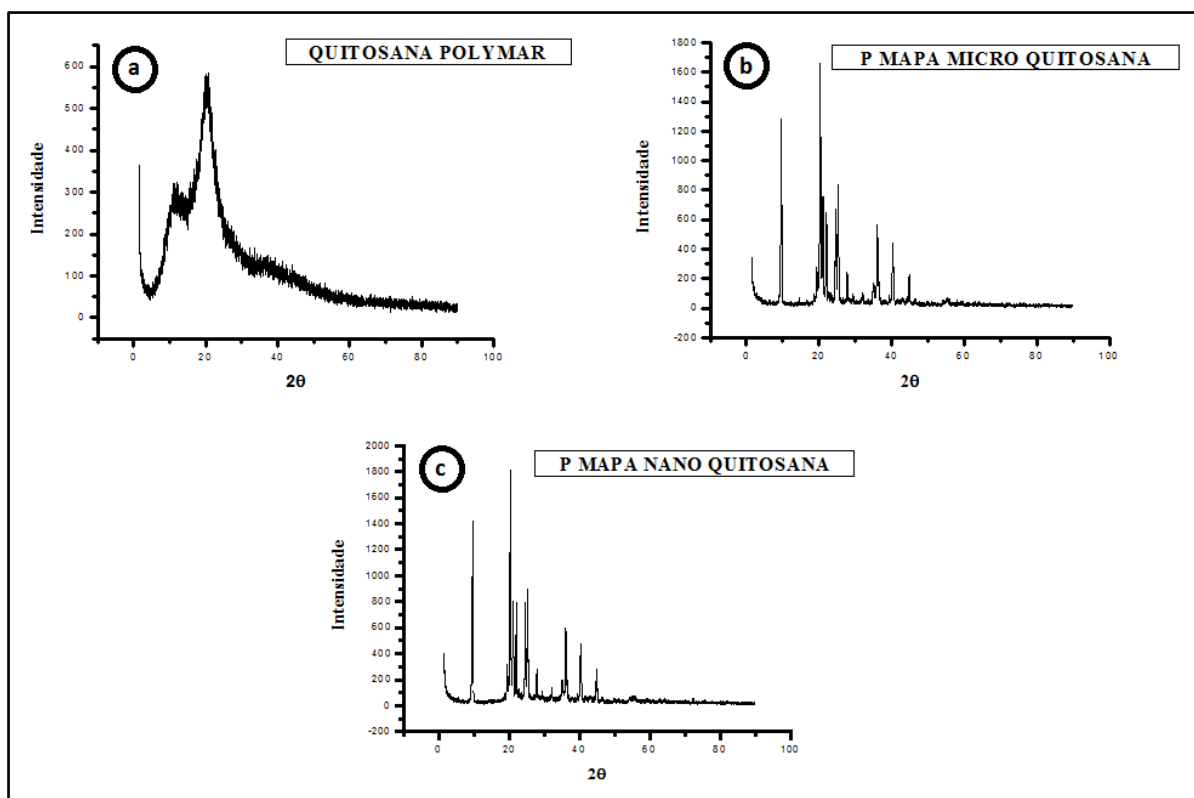
Moghim et al. (2004) também destaca a necessidade de se explorar a hipótese de que elevados índices lipoproteicos nas membranas celulares podem promover proteção e complementar a ativação do pluronic F68 (Blunk et al., 1993).

Através dos dados de Raio X de Difração e Calorimetria Diferencial de Varredura, observou-se que a preparação das misturas em proporções menores de Pluronic F-68 diminuiu e deslocou os sinais referentes ao pluronic. Logo a explicação mais viável seria que a mistura física utilizada nesse estudo (já que não é dissolução) está se formando em misturas eutéticas entre o P-MAPA e o Pluronic F-68 durante o aquecimento até a sua completa transformação amorfa.

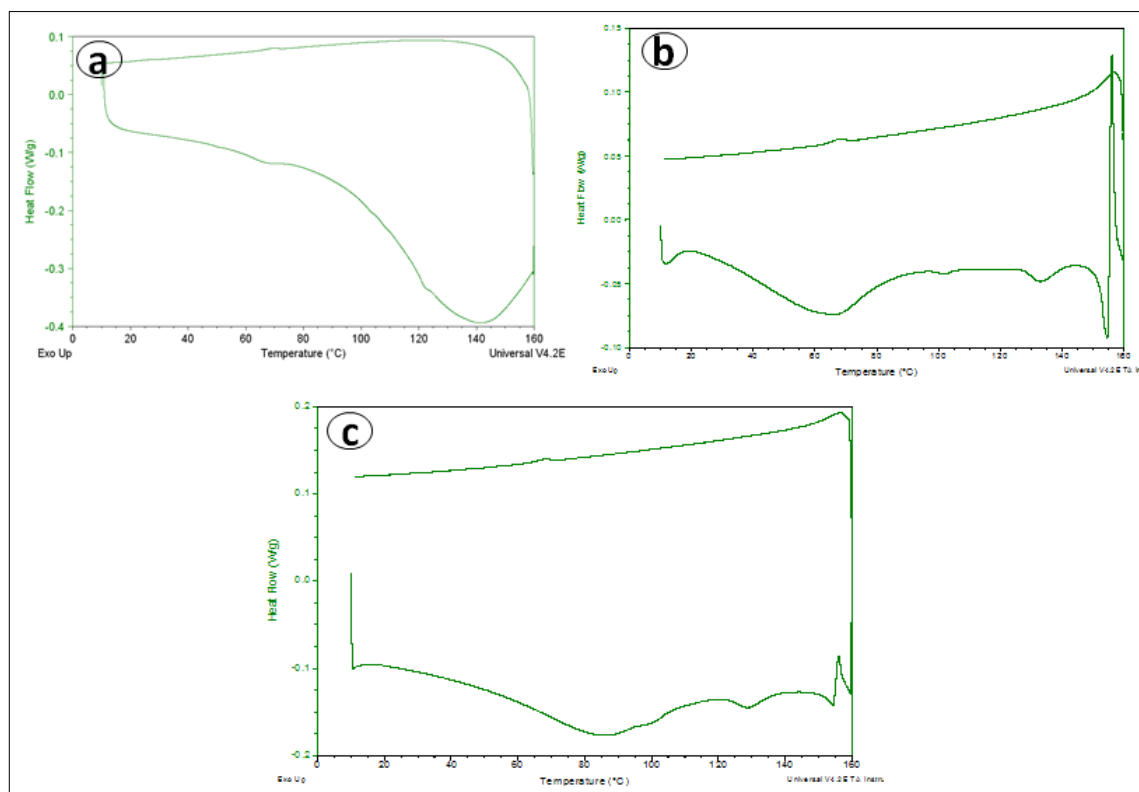
### **3.3 Comparação das formulações de P-MAPA com Quitosana através das análises de Difração de Raio X (XRD), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Os resultados de DSC indicaram que não há interação entre o P-MAPA e a quitosana usados na formulação, logo sugerindo que a formulação poderia ser estável. A ausência do termograma para o P-MAPA na nanopartícula carregando o fármaco indica que o P-MAPA está disperso na matriz do polímero como uma solução sólida. Resultados similares foram observados na interação de famotidina e quitosana (Ramachandran et al., 2011).

Os difratogramas de quitosana apresentaram valores de  $2\theta$  de  $11,7^\circ$  e  $20,2^\circ$  o que está dentro dos valores da literatura (Govidan et al., 2012) (**Figura 15a**). Os picos observados para P-MAPA mostram as características cristalinas deste composto. Entretanto, na presença de quitosana os picos do P-MAPA mudam significativamente na região dos picos da quitosana (**Figura 15b,c**). Isto mostra em certa medida, que as partículas estão dispersas a um nível molecular na matriz de quitosana, já que não há indicação clara da cristalinidade do P-MAPA nas nanopartículas carregando P-MAPA. Logo esta observação está de acordo com os dados observados pelo DSC (**Figura 16a, b e c**).



**Figura 15:** Difratoograma da Quitosana Polymar (a), da formulação P-MAPA micrométrico com quitosana (b) e da formulação de P-MAPA nanonizado com quitosana (c).



**Figura 16:** Termograma (DSC) da Quitosana Polymar (a), da formulação P-MAPA micro com quitosana (b) e da formulação de P-MAPA nanonizado com quitosana (c).

#### 4. Conclusão

O presente projeto obteve sucesso ao desenvolver uma formulação nanométrica para o P-MAPA (lead compound) utilizando Pluronic como estabilizante, este foi efetivo para proteger o produto contra alterações ou perdas pela variação do pH urinário sendo que esta condição normalmente é observada em situações de CBNMI.

A alta da concentração de Pluronic mascarou os sinais do P-MAPA nos refratogramas e os termogramas, porém a preparação das misturas em proporções menores de Pluronic F-68 diminuiu e deslocou os sinais referentes ao Pluronic F68 dando indícios de que esta mistura física está se formando em misturas eutéticas entre o P-MAPA e o Pluronic F-68.

Os resultados de DSC com quitosana indicaram que não há interação entre o P-MAPA e a quitosana indicando que esta formulação poderia ser estável, nos difratogramas das formulações com quitosana os picos do P-MAPA mudaram significativamente na região dos picos da quitosana indicando que as partículas estão dispersas a um nível molecular na matriz de quitosana.

A utilização da quitosana como estabilizante para nanonização de produtos destinados ao tratamento intravesical de câncer de bexiga não é recomendada, devido estabilidade da molécula de quitosana em relação à influência adversa do pH, o que permite sugerir o abandono da quitosana como estabilizante para esta utilização específica ou ainda a necessidade de desenvolvimento de outras formulações que possam proteger a quitosana da influência do elevado pH urinário em um microambiente tumoral.

Com estes resultados podemos afirmar que o estabilizante pluronic F68 apresentou-se mais estável em relação a variação de pH comparando-se com a quitosana, pois observou-se que o tamanho das partículas do P-MAPA não foi alterado em pH básico, onde o mesmo permaneceu em escala nanométrica. Fato este que favorece tratamento, pois ausência de alteração na estrutura do estabilizante (Pluronic F68) garante que sua superfície de contato permaneça inalterada proporcionando uma melhor capacidade de adsorção ao urotélio vesical e, consequentemente, maior efetividade no tratamento do CBNMI quando comparado à imunoterapia com BCG.

Portanto, o presente estudo mostrou que o Pluronic pode ser indicado como um estabilizante factível também para o desenvolvimento de compostos nanonizados para o tratamento intravesical de câncer de bexiga, incluindo o P-MAPA.

## 5. Referências bibliográficas

- ADAMS, M. L.; LAVASANIFAR, A.; KWON, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, v.92, pp. 1343–1355, 2003.
- ADIYAT K.T., KATKOORI D., SOLOWA M.S. Intravesical Chemotherapy. in: Bladder Tumors: Molecular Aspect and Clinical Management. Editores: Lokeshwar, V.B., Merseburger, A.S., Hautmann, S.H., *Editora: Human Press*, pp. 253-270, 2010.
- ANDREAS, B.O.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.* v.170, p.964–969, 2003.
- GROENEWOUD, W. M. Characterisation of Polymers by Thermal Analysis, Chapter 1, s.v, p. 10-60, 2001.
- BADAWI, A. A.; EL-NABARAWI, M. A.; EL-SETOUHY, D. A.; ALSAMMIT, S. A. Characterization and stability testing of itraconazole solid dispersions containing crystallization inhibitors. *Amer. J. Drug. Discovery Develop.*, vol. 1, p. 144-159, 2011.
- BATRAKOVA, E.V.; KABANOV, A.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Contr. Release*, v.130, p.98-106, 2008.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 57, p. 19-34, 2004.
- BAO, H.; PAN, Y.; PING, Y.; SAHOO, N.G.; WU, T.; LI, L.; LI, J.; GAN, L. H. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. *Small.*, v. 7, p. 1569-1578, 2011.
- BILENSOY, E.; SARISOZEN, C.; ESENDAGLI, G.; DOGAN, A.L., AKTAS, Y.; SEN, M.; MUNGAN, N.A. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of mitomycin C to bladder tumors. *Int. J. Pharm.*, v. 371, p. 170–176, 2009.
- BHOLE, A.; BRANDAU, S. Imune mechanisms in *Bacillus Calmette-Guerin* Immunotherapy for superficial bladder cancer. *J. Urol.*, v.170, p.964–969, 2003.
- BURJAK, M.; BOGATAJ, M.; VELNAR, M.; GRABNAR, I.; MRHAR, A. The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. *Int. J. Pharm.*, v. 224, p.123–130, 2001.
- BLUNK T.; HOCHSTRASSER D. F.; SANCHEZ J. C.; MULLER B. W.; MULLER R. H. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.*, v.14 ,p.1382–1387, 1993.

CAPAZ, F.R.; SABAN, R.; BONAMINI, L.V. Vias de administração de fármacos. In: Luiz Biela de Sousa Vale; Ricardo Martins de Oliveira Filho; Roberto de Lucia; Seizi Oga. (Org.). *Farmacologia Integrada*, São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, p. 21-32, 1988.

CHANG, L.C.; Wu, S.C.; Tsai, J.W.; Yu, T.J.; Tsai, T.R. Optimization of epirubicin nanoparticles using experimental design for enhanced intravesical drug delivery, *Int. J. Pharm.*, v. 376, p.195–203, 2009.

CHEN, D.R; BEI, J.Z.; WANG, S.G. Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* v. 67, p. 455-459, 2000.

CHEN, H.; KHEMTONG, C.; YANG, X.; CHANGAND, X.; GAO, J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today*, v. 16, p.354-360, 2011.

CHEN, Y.; ZHANG, G. G. Z.; NEILL, J.; MARSH, K.; SANZGIRI, Y. D. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. *Int J Pharm.*, v. 286, p. 69–80, 2004.

CERDEIRA, A.M.; MAZZOTTI, M.; GANDER, B. Miconazole nanosuspensions: Influence of formulation variables on particle size reduction and physical stability. , *Int. J. Pharm*, v. 396, p. 210-218, 2010.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. *Quim. Nova.*, v. 31, n. 1, p.160-163, 2008.

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

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

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

DURÁN, N.; GOWEN, B. B.; COSTA, F. T. M.; JUSTO, G. Z.; BROCCHI, M.; NUNES, O. D. S.; NUNES, I. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. *Antiviral Res.*, v. 83, p. 143-147, 2009.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; TASIC, L.; MARCATO, P.D. Tecnologia de nanocristais em fármacos. *Quim. Nova* v.33, p.151-158, 2010.

EL-MAGHRABY, G. M.; ALOMRANI, A. H. Synergistic enhancement of itraconazole dissolution by ternary system formation with Pluronic F-68 and hydroxypropylmethylcellulose. *Sci. Pharm.*, v. 77, p. 401- 417, 2009.

EROGLU, M.; IRMAK, S.; ACAR, A.; DENKBAS, E.B. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer, *Int. J. Pharm.*, v.235, p. 51–59, 2002.

FARMABRASILIS, Fármacos e biodiversidade. FARMABRASILIS. Disponível em [www.farmabrasilis.org.br](http://www.farmabrasilis.org.br). Acesso em 10 out. 2014.

FARMABRASILIS, Perfil. FARMABRASILIS. Disponível em <http://www.farmabrasilis.org.br/perfil.php?idioma=br> . Acesso em 10 out. 2014.

FARMABRASILIS, Licenciamento de Produtos. FARMABRASILIS. Disponível em [http://www.farmabrasilis.org.br/licenciamentos\\_produtos.php?idioma=br](http://www.farmabrasilis.org.br/licenciamentos_produtos.php?idioma=br). Acesso em 10 out. 2014.

FATHY, M.; EL-BADRY M. Preparation and evaluation of piroxicam – pluronic solid dispersions. *Bull. Pharm. Sci. Assiut University.*, v. 26, part. 2, p. 97-108, December 2003.

FÁVARO, W. J.; NUNES, O. S.; SEIVA, F. R. F.; 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. Agents and Cancer*, v. 7, p. 14, 2012.

GOVINDAN, S.; NIVETHAA, E. A. K.; SARAVANAN, R.; NARAYANAN, V.; STEPHEN, A. Synthesis and characterization of chitosan–silver nanocomposite. *Appl. Nanosci.*, v. 2, p. 299-303, 2012.

GROENEWOUD, W. M. *Characterisation of Polymers by Thermal Analysis*, Chapter 1, s.v, p. 10-60, 2001.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147-157, 2007.

JORDAN, J.L.; HENDERSON, S.; ELSON, C.M., ZHOU, J.; KYDONIEUS, A.; DOWNIE, J.; LEE, T.D.G. Use of a sulfated chitosan derivative to reduce bladder inflammation in the rat. *Urology*, v. 70, p. 1014–1018, 2007.

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, p.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 orizae*. *Immunopharm. Immunotoxicol.*, v.25, pp.305-319, 2003.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. *Mar. Drugs.*, v.8, pp.1988-2012, 2010.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K.; A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.*, v. 324, p.268-274, 2000.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim. Nova.*, v. 32, nº. 3, p.672-678, 2009.

LIRA, A. A. M.; Nanclares, D. M. A.; Federman Neto, A.; MARCHETTI, J. M. Drug polymer interaction in the all-trans retinoic acid release from chitosan microparticles. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 87, p.899-903, 2007.

LIU, Z.; LIU, D.; WANG, L.; ZHANG, J.; ZHANG, N. Docetaxel-Loaded Pluronic P123 Polymeric Micelles: *in Vitro* and *in Vivo* Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 1684-1696, 2011.

MASSA, W. Crystal Structure Determination. Berlin, Germany. *Springer*. 4<sup>ed</sup>. 226 pp., 2004.

MAGENHEIM, B.; BENITA; S. Nanoparticles characterization. A comprehensive physicochemical approach. *S.T.P. Pharma Sci.*, v. 4, p. 221-241, 1991.

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

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, p.38-45, 2001.

MELO, L. M.; PEROSSO, J.; ALMEIDA, B. F. M.; SILVA, K. L. O.; SOMENZARI, M. A.; LIMA, V. M. F. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. *Int. Immunopharmacol.*, v. 18, p. 373-378, 2014.

MOGHIMI S. M.; HUNTER A. C. Capture of stealth nanoparticles by body's defences. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, v.18, p.527-550, 2001.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; DADSWELL, C. M.; SAVAY, S.; ALVING, C. R.; SZEBENI, J. Causative factors behind poloxamer 188 (Pluronic F68, Flocor)-induced complement activation in human sera. A protective role against poloxamer-mediated complement activation by elevated serum lipoprotein levels. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1689, p. 103-113, 2004.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, v. 89, p. 614-626, 2000.

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

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.

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

POOK, S. H.; ESUVARANATHAN, K.; MAHENDRAN, R. N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized *Mycobacterium bovis* in human bladder cancer cells. *J. Urol.*; v.168, p.780–785, 2002.

REDDY, L. H.; SHARMA, R.K.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A.K.; MURTHY, R.S.R. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice, *J. Control. Release* v. 105, p. 185–198, 2005.

RIDOLFI, D. M; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDID, L.; MACHADO, D.; DURAN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, v.93, p. 36-40, 2012.

RICHIE, J. P.; D`AMICO, A. *Urologic Oncology.*, Saunders Elsevier 1st edition, 2005.

SANTIAGO, M. E. B.; NETO, L. S.; ALEXANDRE, E. C.; MUNARI, D. P.; ANDRADE, M. M. C.; SOMENZARI, M. A.; CIARLINI, P. C.; LIMA, V. M. F. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica.*, v. 127, p. 174-180, 2013.

SILVA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quím. Nova.*, v.29, p.776-785, 2006.

SHIMADA, K.; NAKAMURA, M.; ANAI, S. A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Res.*; v.69, p.3157-3164, 2009.

SUBEDI, R. K.; KANGA, K.W.; CHOI, H. K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin, *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 37, p. 508–513, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova.*, v.26, p. 726-737, 2003.

SCHLÖGL, R. Chapter 5 X-ray Diffraction: A Basic Tool for Characterization of Solid Catalysts in the Working State *Adv. Catal.*, v. 52, p. 273-338, 2009.

STEIM, J. M. Differential scanning calorimetry. *Methods in Enzymology*, v. 32, p. 262-272, 1974.

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, p.16-23, 2000.

VIPPAGUNTA, S. R.; MAUL, K. A.; TALLAVAJHALA, S.; GRANT, D. J. W. Solid-state characterization of nifedipine solid dispersions. *Int. J. Pharm.*, v. 236, p. 111–123, 2002.

XU, Z.; CHEN, L; GU, W.; GAO, Y.; LIN, L.; ZHANG, Z.; XI, Y.; LI, Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma, *Biomaterials*, v. 30, p. 226–232, 2009.

ZHANG, G. G. Z.; NEILLY, J.; MARSH, K.; SANZGIRI, Y. D. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. *Int. J. Pharm.*, v. 286, p. 69–80, 2004.

ZHIRNOV, A. E.; DEMINA, T. V.; KRYLOVA, O. O.; GROZDOVA, I. D.; MELIK-NUBAROV, N. S. Lipid composition determines interaction of liposome membranes with Pluronic L61. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1720, p.73 – 83, 2005.

YOUNG, K. E.; EVANS, A. C.; HODGES, K. V.; BLEACHER, J. E.; GRAFF, T. G. A review of the handheld X-ray fluorescence spectrometer as a tool for field geologic investigations on Earth and in planetary surface exploration. *Appl. Geochem.*, v. 72, p. 77-87, 2016.

WALSH, P.C.; RETIK, A.B.; VAUGHAN, E.D. *Campbell's Urology.*, 7 ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2007.

## 4.2 Capítulo 2

### **P-MAPA e o carcinoma de bexiga urinária não músculo invasivo (CBNMI): Mecanismos de reparo de lesão, EROS e angiogênese**

#### **RESUMO**

Segundo a Sociedade Americana do Câncer o carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário nos Estados Unidos e, atualmente o tratamento mais eficaz para esta doença é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) que, entretanto, ocasiona efeitos colaterais de intensidades variadas e apresenta altas taxas de recorrência. Desta forma, o desenvolvimento de novas moléculas que reduzam as taxas de recorrência, os efeitos colaterais e a progressão tumoral é muito relevante. Diante deste cenário destaca-se o imunomodulador P-MAPA abrindo uma nova perspectiva para o combate do CBNMI. Assim, os objetivos principais deste estudo foram comparar os efeitos histopatológicos e moleculares do imunomodulador P-MAPA nanonizado e estabilizado com quitosana e pluronic com a imunoterapia com BCG no tratamento da progressão do CBNMI induzido em ratos. Para a avaliação da atividade antitumoral do P-MAPA comparada com BCG utilizou-se 35 ratas da linhagem Fischer 344. Desses animais, 30 foram submetidos a indução química do CBNMI através da instilação intravesical de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) e os outros 5 animais foram considerados como Grupo (controle) e receberam solução fisiológica. Duas semanas após a última dose de MNU, dividiu-se os animais em 6 grupos a saber, grupo câncer (MNU) animais que foram submetidos a instilação intravesical de MNU e receberam solução fisiológica, grupo MNU+BCG, animais que foram tratados com BCG 10<sup>6</sup> UFC (40 mg), Grupo MNU+P-MAPA-Micro Pluronic, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA disperso em solução aquosa de Pluronic F68 (5% m/v), grupo MNU+P-MAPA-Micro Quitosana, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA disperso em solução aquosa de Quitosana (1,33%); grupo MNU+P-MAPA-Nano Pluronic, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA nanonizado disperso em solução aquosa de Pluronic F68 e grupo MNU+P-MAPA-Nano Quitosana, animais que foram tratados com uma dose de 1mg/mL de P-MAPA nanonizado disperso em solução aquosa de Quitosana. Todos os tratamentos foram administrados por via intravesical por 6 semanas consecutivas. Após o tratamento, todas as bexigas foram coletadas e submetidas às análises histopatológicas e *Western Blotting*. O presente estudo comprovou que a utilização do Pluronic como estabilizante para o desenvolvimento de formulações de compostos terapêuticos para o tratamento intravesical de câncer de bexiga mostrou-se eficiente em proteger o produto contra alterações ou perdas pela variação do pH urinário. Ainda, nossos resultados demonstraram que as formulações com P-MAPA nano Pluronic e P-MAPA micro Pluronic promoveram ativação equivalente do sistema imune inato e adaptativo mediada pelos receptores *Toll-like* 2 e 4 em relação ao BCG. Assim, o P-MAPA nanonizado na presença de pluronic é um potencial candidato para o tratamento do CBNMI.

**Palavras-chave:** câncer de bexiga, P-MAPA, imunoterapia, receptores TLR, interferons.

## 1. Introdução

### 1.1 Arquitetura Urotelial e Carcinoma de Bexiga Urinária

Segundo a Sociedade Americana do Câncer o carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário nos Estados Unidos. O câncer de bexiga é uma doença que envolve o urotélio que é caracterizado por um epitélio transicional composto por uma camada de células superficiais (ou em guarda-chuva, altamente diferenciadas), intermediárias e basais (Kroft e Oyasu, 1994). As células superficiais expressam quatro grandes proteínas integrais de membrana, as uroplaquinas (UP) as quais são denominadas: UPIa (27 kDa), UPIb (28 kDa), UPII (15 kDa) and UPIIIa (47 kDa) (Wu et al., 1990) estas, constituem as placas uroteliais (Zupančič et al., 2011).

Na membrana plasmática apical, as placas uroteliais formam microplacas que contribuem para a funcionalidade da barreira sangue-urina (Zupančič et al., 2011). O fato de que as UP são os produtos principais da diferenciação urotelial implica que elas seriam reguladas durante a citodiferenciação, transformação e carcinogênese urotelial (Zupančič et al., 2011). Ogawa et al. (1999) demonstraram em ratos com carcinoma urotelial induzido com *N* butil-*N*-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN) que a expressão de UP foi reduzida nas células superficiais.

Outra estrutura muito importante é o desmossomo, que é a maior junção adesiva intercelular do urotélio, sendo composto por moléculas de adesão celular da família das caderinas conhecidas por desmocollinas (DSC) e desmogleínas (DSG) (Hayashi et al., 2011). Existem quatro subtipos de DSG (DSG 1, DSG2, DSG3, DSG4) e três de DSC (DSC 1, DSC 2, DSC3), que diferem entre si em relação a sua reatividade imunológica e pela sua distribuição diferencial em tipos celulares ou tecidos distintos.

Estudos imunohistoquímicos indicaram que todos os epitélios escamosos não-cancerosos e 61-98% dos carcinomas escamosos da cavidade oral, esôfago, pele e pulmão foram positivos para várias isoformas desmossomais (Hayashi et al., 2011). Ainda, não há estudos imunohistoquímicos e moleculares que correlacionam a expressão das diferentes isoformas desmossomais na progressão e diferenciação do carcinoma da bexiga urinária (CB).

## 1.2 – Carcinoma de Bexiga Urinária: Espécies Reativas de Oxigênio, Angiogênese e Vias de Sinalização p53, Receptores Toll Like (TLR) e NF- $\kappa$ B

A incidência de doenças relacionadas a processos cancerígenos no organismo envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) vem merecendo especial atenção nos últimos anos (Ichimura et al., 2004; Bayraktar et al., 2010). EROs ou radicais livres (RLs) são moléculas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron não-pareado no orbital mais externo (Elsbach e Weiss, 1983). Essa configuração eletroquímica permite a interação com macromoléculas biológicas podendo causar alterações nos componentes celulares: proteína, DNA e lipídio (Brown-Borg et al., 1999). Dentre as espécies radicalares causadoras de danos à célula tem-se: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ).

EROs são consideradas carcinógenos efetivos podendo participar da iniciação, progressão e metástase das neoplasias (Eblin et al., 2008). Elevadas quantidades de  $H_2O_2$  são produzidas e excretadas pelas células tumorais, confirmando sua importância na propagação e invasão tumorais. As enzimas NADPH oxidases (NOX) são as principais fontes de EROs celular (Segal & Shatwell, 1997; Shimada et al., 2011). A redução do oxigênio molecular dependente da NOX é responsável por gerar EROs na célula, na forma de  $O_2^-$ , o qual é dismutado para formar  $H_2O_2$  (Khandrika et al., 2009; Shimada et al., 2011). Estudos demonstraram que baixos níveis de EROs geradas por NOX podem atuar como mediadores da inflamação, apoptose, proliferação celular e angiogênese em vários cânceres humanos (Shimada et al., 2011).

Em 2009 Shimada e colaboradores identificaram que a geração de  $H_2O_2$  por NOX1 aumentou a resistência à apoptose de células uroteliais cancerosas humanas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e concluíram que a geração de EROs através de NOX1 desempenhou um importante papel na progressão do CB, mas não nas etapas iniciais da carcinogênese ou sobrevivência da célula cancerosa urotelial. Também, Shimada et al. (2011) demonstraram que NOX4 foi responsável pela manutenção de EROs intracelular tanto nos carcinomas uroteliais não-músculo invasivos de baixo e alto graus como nos tumores músculo-invasivos, demonstrando que NOX4 está envolvida desde as etapas iniciais da carcinogênese urotelial até o desenvolvimento da doença músculo-invasiva.

EROs aumentam nas células tumorais a produção de fatores angiogênicos, como a interleucina 8 (IL-8) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e a secreção de

metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), uma gelatinase que auxilia o crescimento de vasos sanguíneos no interior do microambiente tumoral (Brown e Bicknell, 2001).

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes e possui um papel importante no crescimento e desenvolvimento, cicatrização de feridas e na tumorigênese (Shibuya e Claesson-Welsh, 2006). O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração e produção de óxido (Waltenberger, 2009). Além disso, a ação do VEGF protege o endotélio da apoptose (Waltenberger, 2009).

Além do papel das EROs, é importante avaliar o microambiente tumoral que, é caracterizado por uma flutuação de hipóxia e privação de nutrientes, os quais levam ao aumento das adaptações de clones genéticos e epigenéticos, bem como ao aumento da invasividade e metástase (Semenza, 2003; Kimbro e Simons, 2006). Por sua vez, essas adaptações hipóxicas conferem aos tumores maior resistência às terapias atuais (Semenza, 2003; Kimbro e Simons, 2006). Parte desta adaptação é a regulação de genes em resposta à hipóxia. Muitos destes genes são regulados pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1) (Semenza, 2003; Kimbro e Simons, 2006).

Porém um potente inibidor direto endógeno da angiogênese é a endostatina, a qual induz apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'Reilly et al. 1997; Schmidt et al., 2004). É, portanto, uma potente substância antitumoral, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos (O'Reilly et al., 1997).

Outro fator importante na progressão do CB, é o fator de transcrição eritróide 2p45 (NF-E2), relacionado ao fator 2 (Nrf2) medeia a expressão de enzimas de proteção através do elemento de resposta antioxidante (ARE) em diferentes tipos de cânceres (Slocum e Kensler, 2011). Iida et al. (2004) demonstraram que o Nrf2 desempenha um importante papel na detoxicação de agentes cancerígenos derivados metabolicamente a partir de um composto *N-nitroso*, o qual é encontrado no cigarro de tabaco. Esses mesmos autores demonstraram que a incidência de CB induzido quimicamente foi mais elevada em camundongos deficientes para Nrf2 quando comparada com camundongos não deficientes para esse fator. Estudos de Slocum e Kensler (2011) demonstraram que o Nrf2 e vários dos seus genes alvo foram significativamente infraregulados no CB e como resultado, as células uroteliais foram expostas continuamente ao estresse oxidativo, com consequente progressão para a doença músculo-invasiva.

O potencial dos carcinógenos químicos no CB pode ser modulado pela via do Nrf2 através de um efeito sinérgico com p53 (Iida et al., 2007). A proteína p53 desempenha um papel

fundamental na regulação do ciclo celular normal e apoptose (Erill et al, 2004). As alterações da proteína p53 levam à perda de sua função de supressão tumoral (Erill et al, 2004). Iida et al. (2007) demonstraram que camundongos deficientes para Nrf2 juntamente com mutação em um único alelo para p53, quando induzidos quimicamente para o CB, apresentaram incidência significativamente maior de CB do que camundongos com apenas um tipo de deficiência (deficiência para Nrf2 ou deficiência para p53). Tal fato demonstra a natureza cooperativa entre Nrf2 e p53 na defesa contra insultos cancerígenos, atuando como um mecanismo de dupla defesa (Wakabayashi et al., 2010; You et al. 2011). Assim, a interação entre Nrf2 e p53 com as enzimas antioxidantes e EROs necessita de maiores elucidações.

Estudos de sequências promotoras de resposta ao gene p53 sugerem um papel geral desse como regulador dos danos ao DNA e no controle da expressão gênica dos Receptores *Toll-Like* (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). Os TLRs pertencem a uma família de receptores transmembrana que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (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 e Takeda, 2004; Galli et al., 2010), os quais podem interferir na proliferação do câncer e angiogênese por um mecanismo ainda não completamente compreendido (Grote et al., 2011).

Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Akira e Takeda, 2004; Galli et al., 2010).

A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos antineoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos e humanos (Rakoff-Medzhitov e Nahoum, 2009). Os TLRs podem causar regressão tumoral por duas maneiras: em primeiro lugar, através da alteração do microambiente tumoral e inibição da angiogênese e, segundo, recrutando leucócitos, os quais determinam a lise das células tumorais pelas células *natural killer* (NK) e células T citotóxicas (Rakoff-Medzhitov e Nahoum, 2009; Grote et al., 2011). 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).

A via de sinalização do NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante nas respostas ao câncer e inflamação (Meng et al., 2010). A ampla distribuição dos sítios de ligação do NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B responde a várias moléculas, como IL-1, TNF- $\alpha$ , citocromo P450, melatonina e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Pham et al., 2004; Luo et al., 2005). Meng et al. (2010) demonstraram que o aumento da atividade do NF- $\kappa$ B em células tumorais resultou no aumento das enzimas antioxidantes, o que conferiu resistência ao estresse oxidativo.

### **1.3 Indução química do Carcinoma de Bexiga Urinária**

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 (Reis et al., 2009) que são instilados diretamente na bexiga dos animais (Crallan et al., 2006). Em 1972, Hicks e Wakefield utilizaram 4 doses de *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU) para rápida indução de CB 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 CB (Perabo et al., 2005; Reis et al., 2010).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Avaliação e comparação da atividade antitumoral in vivo dos nanocristais de P-MAPA com a imunoterapia com BCG

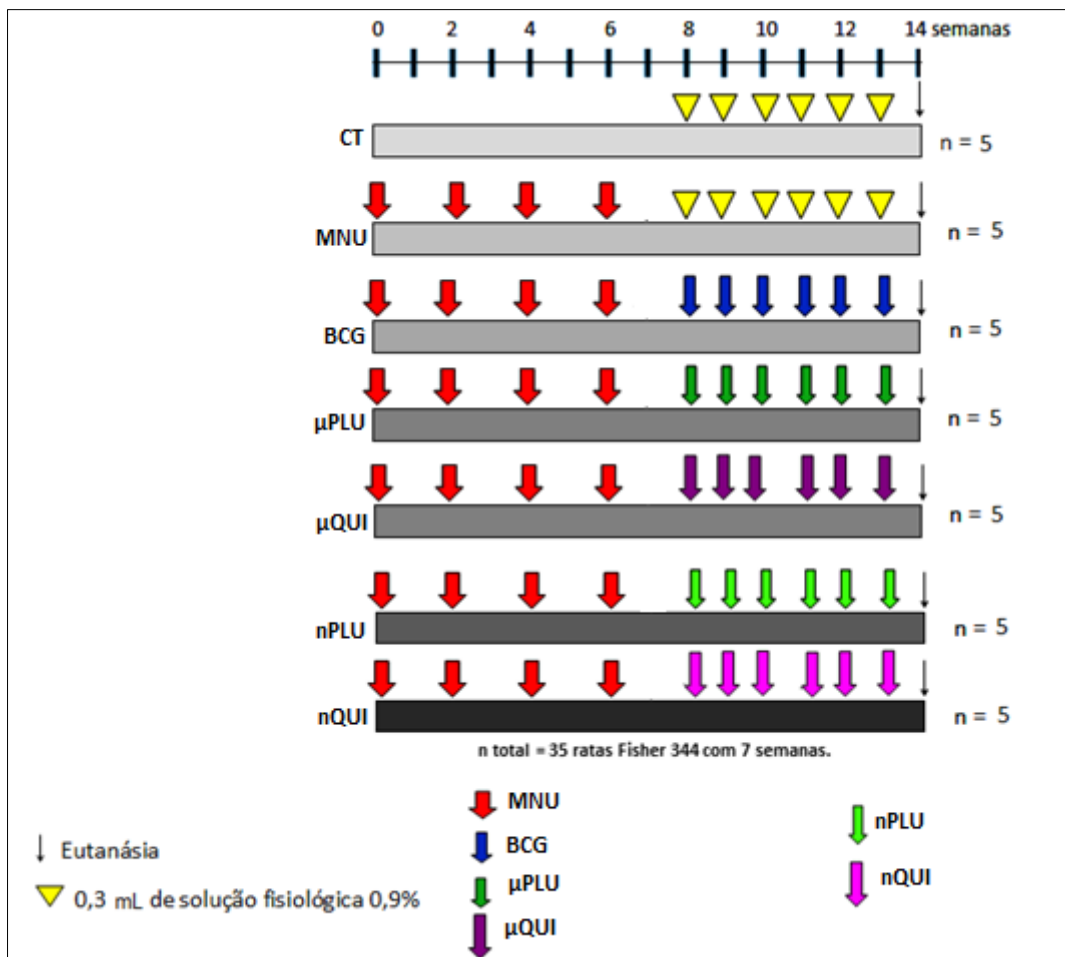
#### 2.1.1 Protocolo de Indução do CBNMI

Foram utilizadas 35 ratas da linhagem Fischer 344, na faixa etária de 7 semanas, pesando em média 150 gramas, obtidas no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Para a realização dos experimentos o protocolo seguiu rigorosamente os princípios éticos em pesquisa animal (CEUA/ UNICAMP – Protocolo número 2684-1).

Para a indução de CBNMI utilizou-se *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU) diluído em solução de citrato de sódio e, administrado por via intravesical (Fávaro et al., 2012). 30 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, EUA), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/kg de *N*-metil-*N*-nitrosouréia (MNU - Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 0,3 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (Fávaro et al., 2012). Para os procedimentos de indução utilizou-se cabine de segurança classe II A2 (*The Baker Company, Sanford, ME, EUA*). Os outros 5 animais que não receberam MNU foram considerados como **Grupo 1: Grupo Controle (CT)**: recebeu uma dose intravesical de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012). Duas semanas após a indução com MNU, os animais foram divididos em 6 grupos (5 animais por grupo): **Grupo 2: Câncer (MNU)**: recebeu uma dose intravesical de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012); **Grupo 3: MNU+BCG (BCG)**: recebeu uma dose intravesical de  $10^6$  UFC – 40 mg de BCG (*Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil*) diluída em 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas (Fávaro et al., 2012); **Grupo 4: MNU+P-MAPA-Micro Pluronic (μPLU)**: recebeu uma dose intravesical de 0,2 mg de P-MAPA (Farmabrilis, São Paulo, Brasil) dissolvida em 0,2 mL (concentração de 1mg/mL) de solução aquosa de Pluronic F68 (5% m/v) (Sigma-Aldrich, EUA) por 6 semanas consecutivas; **Grupo 5: MNU+P-MAPA- Micro Quitosana (μQUI)**: recebeu uma dose intravesical de 0,2 mg de P-MAPA (Farmabrilis, São Paulo, Brasil) dissolvida em 0,2 mL (concentração de 1mg/mL) de solução aquosa de Quitosana (1,33%) (105 kDa / ~81% acetilação, Polymar) por 6 semanas consecutivas; **Grupo 6: MNU+P-MAPA-Nano Pluronic**

**(nPLU):** recebeu uma dose intravesical de 0,2 mg de P-MAPA nanonizado dissolvida em 0,2 mL (concentração de 1mg/mL) de solução aquosa de Pluronic F68 (5% m/v) por 6 semanas consecutivas; **Grupo 7: MNU+P-MAPA-Nano Quitosana (nQUI):** recebeu uma dose intravesical de 0,2 mg de P-MAPA nanonizado dissolvida em 0,2 mL (concentração de 1mg/mL) de solução aquosa de Quitosana (1,33%) por 6 semanas consecutivas (**Figura 1**).

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 14 semanas de experimento, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas e moleculares.



**Figura 1.** Esquema de indução e tratamento dos animais.

### 2.1.2 Análises Histopatológicas

Amostras da bexiga urinária de todos os animais de cada grupo foram coletadas, fixadas em solução de Bouin por doze horas e inclusas em polímeros plásticos (*Paraplast Plus*, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *Biocut 1130* (*Reichert-Jung*, Munique, Alemanha) com espessura de 5 µm, corados em Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio *Nikon Eclipse Ni-U* (*Nikon*, Tóquio, Japão) equipado com câmera *Nikon DS-RI-1* (*Nikon*, Tóquio, Japão). 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).

### 2.1.3 Avaliação da atividade anticarcinogênica *in vitro* do Pluronic F68

A atividade antiproliferativa foi avaliada utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks et al., 1991). Foram empregadas nove linhagens de células tumorais humanas (**Tabela 1**). Estas linhagens foram cedidas pelo NCI (*National Cancer Institute*, EUA) e são mantidas no laboratório de cultura de células em frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Nunc®), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 1-** Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

| Linhagem      | Órgão/Doença                                | Morfologia    |
|---------------|---------------------------------------------|---------------|
| MCF-7         | Mama; adenocarcinoma                        | Epitelial     |
| NCI-ADR/RES * | Ovário; adenocarcinoma                      | Epitelial     |
| 786-O         | Rim; adenocarcinoma                         | Epitelial     |
| NCI-H460      | Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células | Epitelial     |
| PC-3          | Próstata; adenocarcinoma                    | Epitelial     |
| OVCAR-3       | Ovário; adenocarcinoma                      | Epitelial     |
| HT-29         | Cólon; adenocarcinoma                       | Epitelial     |
| K562<br>U251  | Medula óssea; Leucemia                      | Linfoblástica |

\* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc®), de uma suspensão com densidade de inoculação entre  $3 \times 10^4$  e  $6,5 \times 10^4$  cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plus®). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 100 µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) (**Figura 2**).

Para o preparo das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada amostra foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5% SFB, para o preparo da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para o preparo das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

As amostras foram adicionadas às placas. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T0, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1 h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50 µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%,

e mantidas por 60 min a 4°C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma®), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração de cada amostra, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular

Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

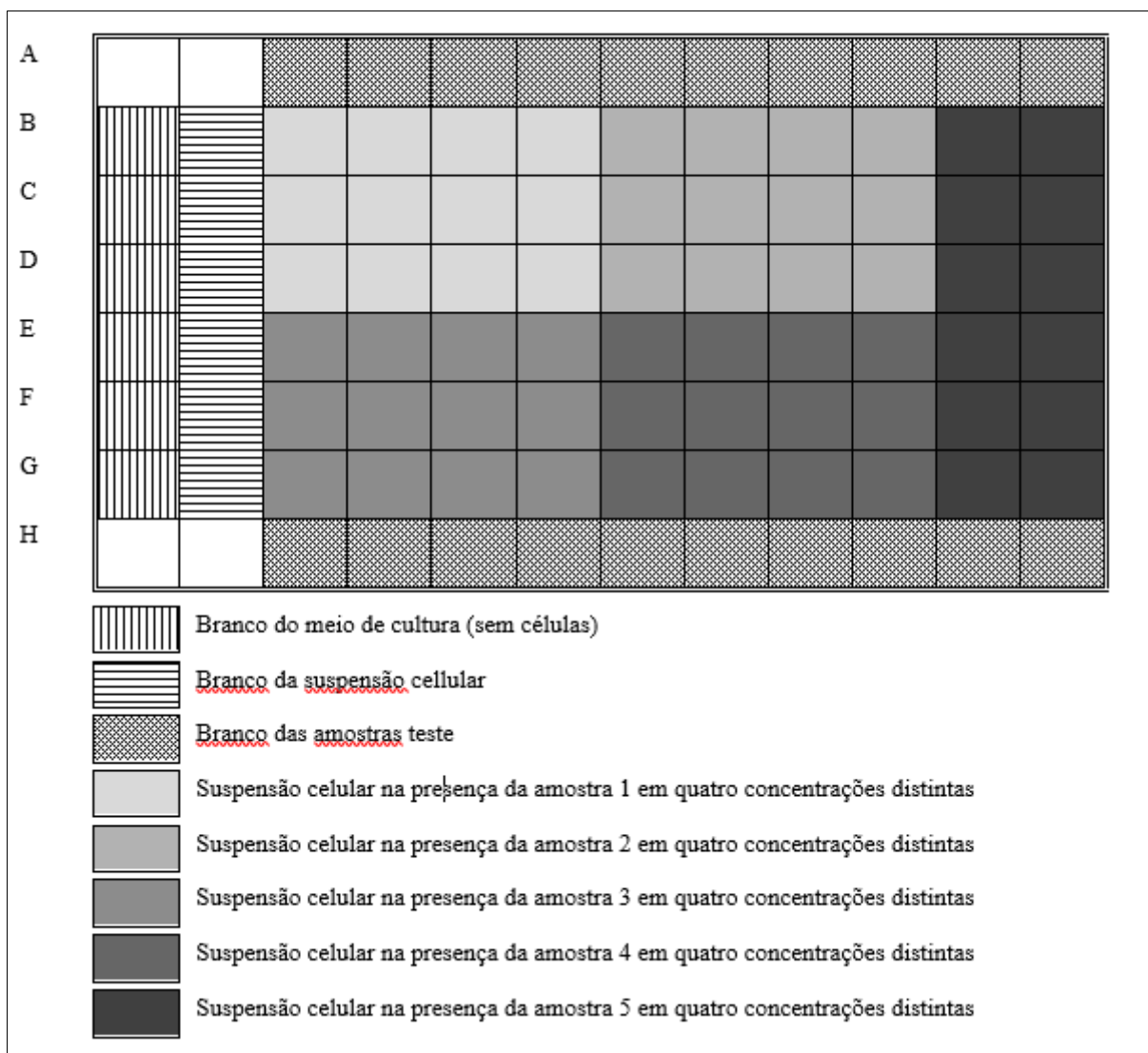
Se  $T \leq T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

$T$  = média da absorbância da célula tratada - absorbância da amostra sem célula

$T_1$  = absorbância do branco de células.

$T_0$  = absorbância do controle de células na placa  $T_0$ .



**Figura 2:** Esquema demonstrativo da aplicação das amostras, em quatro concentrações distintas, na placa teste.

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada. A concentração efetiva denominada  $GI_{50}$  (do inglês *growth inhibition*) que representa a concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento celular (Shoemaker, 2006), foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

#### **2.1.4 Análises de Western Blotting para os fatores indutores e reparadores de lesão celular (TLRs 2 e 4, Nrf2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, P53, IFN- $\gamma$ , MMP-2, IRF3), balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF, HIF 1 $\alpha$ e Endostatina), proteínas de organização e distribuição estruturais do urotélio (UP, DSC, DSG) e para as enzimas formadoras de EROs (NOX1 e NOX4)**

Coletou-se amostras de bexiga urinária de 5 animais de cada grupo experimental, estas foram congeladas e, posteriormente, submetidas as análises por *Western Blotting*. As bexigas urinárias foram homogeneizadas em tampão de extração contendo, Triton-x-1%, NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, Hepes 1 mM pH 7,6, PMSF 0,2 mM e 10  $\mu$ L/mL de coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*). Os extratos das bexigas urinárias foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o micrométodo de *Bradford* (Bradford, 1976). O correspondente a 70  $\mu$ g de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Ge Helthcare, Alemanha). As membranas foram bloqueadas com a utilização de RapidBlock™ Solution 10X da Amresco® diluído em água destilada por cinco minutos e incubadas com os anticorpos primários (**Tabela 2**). A  $\beta$ -Actina foi utilizado como controle endógeno (monoclonal *mouse sc47778 Santa Cruz Biotechnology, EUA*). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit, anti-mouse e anti goat* HRP conjugados diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). 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 2:** Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação e *Western Blotting*.

| <i>Anticorpos Primários</i> | <i>Espécie hospedeira</i> | <i>Código</i> | <i>Fonte</i>    |
|-----------------------------|---------------------------|---------------|-----------------|
| UP                          | Camundongo (monoclonal)   | orb27370      | Biorbyt, UK     |
| DSC                         | Coelho (policlonal)       | orb100705     | Biorbyt, UK     |
| DSG                         | Coelho (policlonal)       | orb100292     | Biorbyt, UK     |
| NOX1                        | Coelho (policlonal)       | orb6469       | Biorbyt, UK     |
| NOX4                        | Coelho (monoclonal)       | orb 11151     | Biorbyt, UK     |
| TLR2                        | Coelho (policlonal)       | ABBI-251110   | Abbiotec, EUA   |
| TLR4                        | Coelho (policlonal)       | ABBI-251111   | Abbiotec, EUA   |
| Nrf2                        | Coelho (policlonal)       | sc722         | Santa Cruz, EUA |
| TNF- $\alpha$               | Cabra (policlonal)        | sc1350        | Santa Cruz, EUA |
| NF- $\kappa$ B              | Coelho (policlonal)       | ab7970        | Abcam, EUA      |
| IRF3                        | Camundongo (monoclonal)   | sc376455      | Santa Cruz, EUA |
| IL-6                        | Coelho (policlonal)       | ABBI-251278   | Abbiotec, EUA   |
| p53                         | Rabbit (policlonal)       | sc6243        | Santa Cruz, EUA |
| IFN- $\gamma$               | Camundongo (monoclonal)   | 507802        | Biolegend, EUA  |
| MMP-2                       | Coelho (policlonal)       | orb18098      | Biorbyt, UK     |
| HIF                         | Coelho (monoclonal)       | ABBI-251256   | Abbiotec, EUA   |
| VEGF                        | Coelho (policlonal)       | orb10590      | Biorbyt, UK     |
| Endostatina                 | Coelho (policlonal)       | orb10590      | Biorbyt, UK     |

### 2.1.5 Análise do pH urinário

Amostras de urina (200  $\mu$ L) foram coletadas da bexiga urinária via cateter flexível 20 gauge (*Abocath*, São Paulo, Brasil) de todos os animais de cada grupo no momento da eutanásia. Posteriormente, a urina de cada animal foi aplicada no parâmetro de pH numa urofita reagente (*Urofita 10 DLU*, *Prodinol Biotecnologia*), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

### 2.1.6 Análises Estatísticas

Os parâmetros quantificados através das técnicas de Western Blotting foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados 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 e Discussão

#### 3.1 Avaliação e comparação da atividade antitumoral *in vivo* dos micro e nanocristais de P-MAPA estabilizados com Pluronic versus imunoterapia com BCG

##### 3.1.1 Análises Histopatológicas

O trato urinário do grupo CT não apresentou alterações estruturais (**Figuras 3a, 3b; Tabela 3**). 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 3a, 3b**).

Em contraste, o trato urinário do grupo MNU apresentou drásticas alterações histopatológicas, tais como: hidronefrose e hidroureter; carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (**Figuras 3c, 3d**), carcinoma papilífero (pTa) e metaplasia escamosa foram encontrados na bexiga urinária em 80%, 20%, e 60% dos animais, respectivamente (**Tabela 3**). O carcinoma papilífero (pTa) (**Figuras 3e, 3f, 3m, 3n**) 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. A metaplasia escamosa foi caracterizada por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear (**Figura 3m**). O carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (**Figuras 3c, 3d, 3i, 3j**) 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 papilífero (pTa) (40%) (**Figuras 3e, 3f**), a neoplasia intraurotelial de baixo grau (40%) e o carcinoma *in situ* (pTis) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo BCG (**Tabela 3**). Além disso, o trato urinário do grupo BCG apresentou marcantes alterações macroscópicas, tais como: lesões císticas nos rins, hidroureter, espessamento e lesões papilíferas na bexiga urinária. A neoplasia intraurotelial de baixo grau foi caracterizada por aumento do número de camadas celulares no urotélio, hipercromasia nuclear e displasia. 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.

As características macroscópicas do trato urinário do grupo  $\mu$ PLU foram semelhantes às encontradas no grupo CT. Na bexiga urinária, o urotélio normal foi encontrado em 20% dos animais (**Tabela 3**). As alterações histopatológicas mais frequentes no grupo  $\mu$ PLU foram: hiperplasia plana (60%) (**Figuras 3g, 3h**) e hiperplasia papilífera (20%) (**Tabela 3**). As hiperplasias planas e papilíferas foram caracterizadas por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas (**Figuras 3g, 3h**).

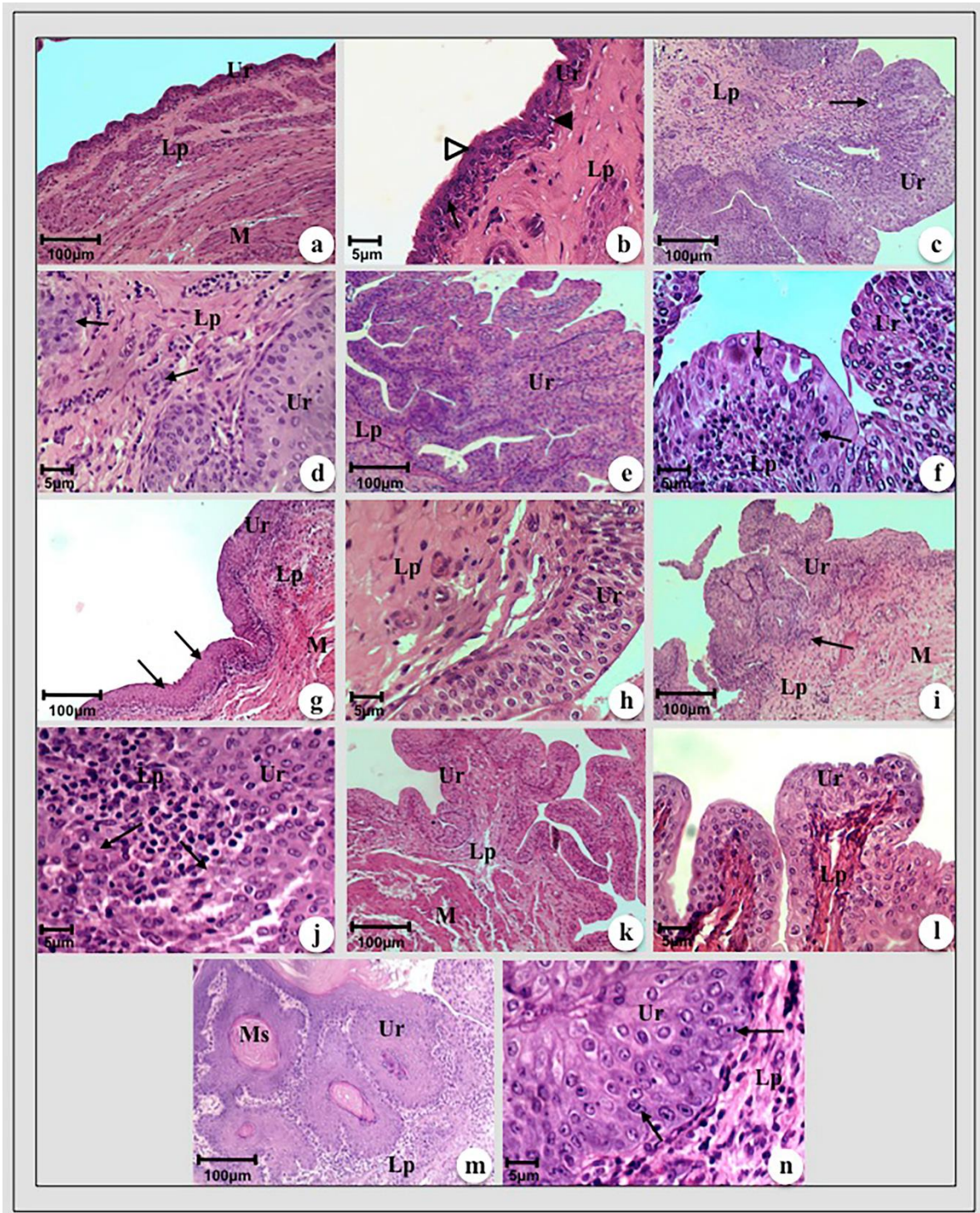
O trato urinário do grupo  $\mu$ QUI apresentou drásticas alterações histopatológicas, tais como: hidronefrose e hidroureter; carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (**Figuras 3i, 3j**), carcinoma papilífero (pTa), carcinoma *in situ* (pTis) e metaplasia escamosa foram encontrados na bexiga urinária em 40%, 40%, 20% e 40% dos animais, respectivamente (**Tabela 3**).

A hiperplasia papilífera (60%) (**Figuras 3k, 3l**), a neoplasia intraurotelial de baixo grau (20%) e a hiperplasia plana (20%) (**Tabela 3**) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo nPLU. Similarmente ao Grupo MNU, o grupo nQUI apresentou drásticas alterações histopatológicas, destacando-se carcinoma papilífero (pTa) (60%) (**Figuras 3m, 3n; Tabela 3**), carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) (40%) e metaplasia escamosa (60%) (**Figura 3m; Tabela 3**). Também, foram observadas alterações macroscópicas como hidronefrose e hidroureter.

A ocorrência de cálculos urinários e hematúria macroscópica foram observadas nos grupos MNU, BCG,  $\mu$ QUI e nQUI. Tais alterações foram ausentes nos grupos  $\mu$ PLU e nPLU.

**Tabela 3.** Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais dos grupos CT, MNU, BCG,  $\mu$ PLU,  $\mu$ QUI, nPLU e nQUI.

| Grupos                                                               |                |                 |                 |                       |                       |                  |                  |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Histopatologia                                                       | Grupo CT (n=5) | Grupo MNU (n=5) | Grupo BCG (n=5) | Grupo $\mu$ PLU (n=5) | Grupo $\mu$ QUI (n=5) | Grupo nPLU (n=5) | Grupo nQUI (n=5) |
| Normal                                                               | 05 (100%)      | -               | -               | 01 (20%)              | -                     | -                | -                |
| Hiperplasia Plana                                                    | -              | -               | -               | 03 (60%)              | -                     | 01 (20%)         | -                |
| Hiperplasia Papilífera                                               | -              | -               | -               | 01 (20%)              | -                     | 03 (60%)         | -                |
| Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau                                  | -              | -               | 02 (40%)        | -                     | -                     | 01 (20%)         | -                |
| Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis) | -              | -               | 01 (20%)        | -                     | 01 (20%)              | -                | -                |
| Carcinoma Papilífero (pTa)                                           | -              | 01 (20%)        | 02 (40%)        | -                     | 02 (40%)              | -                | 03 (60%)         |
| Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)              | -              | 04 (80%)        | -               | -                     | 02 (40%)              | -                | 02 (40%)         |



**Figuras 3a – 3n:** Fotomicrografias das alterações histopatológicas mais frequentes das bexigas urinárias dos grupos CT (a, b), MNU (c, d), BCG (e, f),  $\mu$ PLU (g, h),  $\mu$ QUI (i, j), nPLU (k, l) e nQUI (m, n). (a), (b) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**), uma camada intermédia de células (**seta**), e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**cabeça de seta aberta**). (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) caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade; numerosas figuras de mitose (**setas**). (g), (h) Hiperplasia plana (**setas**) caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas. (i), (j) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**setas**) invadindo a lâmina própria. (k), (l) Hiperplasia papilífera caracterizada por espessamento do urotélio com papilomatose e ausência de atipias citológicas. (m), (n) Carcinoma papilífero (pTa) associado à metaplasia escamosa (**Ms**) caracterizado por extensas lesões papilíferas com intensas atipias citológicas (**setas**) a - n: **Lp** – lâmina própria, **M** - camada muscular, **Ur** - urotélio.

Os resultados histopatológicos demonstraram tumor indiferenciado, caracterizando carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero (pTa) e metaplasia escamosa no grupo MNU, demonstrando que o MNU foi efetivo na indução do CBNMI nesse modelo animal. Nos animais submetidos a imunoterapia com BCG, as alterações histopatológicas mais frequentes foram carcinoma papilífero (pTa), neoplasia intraurotelial de baixo grau e carcinoma *in situ* (pTis). Contudo, os animais tratados com  $\mu$ PLU e nPLU apresentaram melhor recuperação histopatológica do estado de câncer do que a observada no grupo de animais tratados com BCG e P-MAPA estabilizado com Quitosana. Os animais dos grupos  $\mu$ QUI e nQUI apresentaram alterações histopatológicas similares ao grupo MNU, não evidenciando qualquer redução da progressão tumoral.

### 3.1.2 Análise do pH urinário

Através das análises de urina, observou-se que o ambiente apresentado pela bexiga urinária acometida por carcinoma apresentou pH básico com valores entre 8 e 9, sendo que na bexiga dos animais do grupo controle os valores de pH foram ácidos ficando entre 5 e 6.

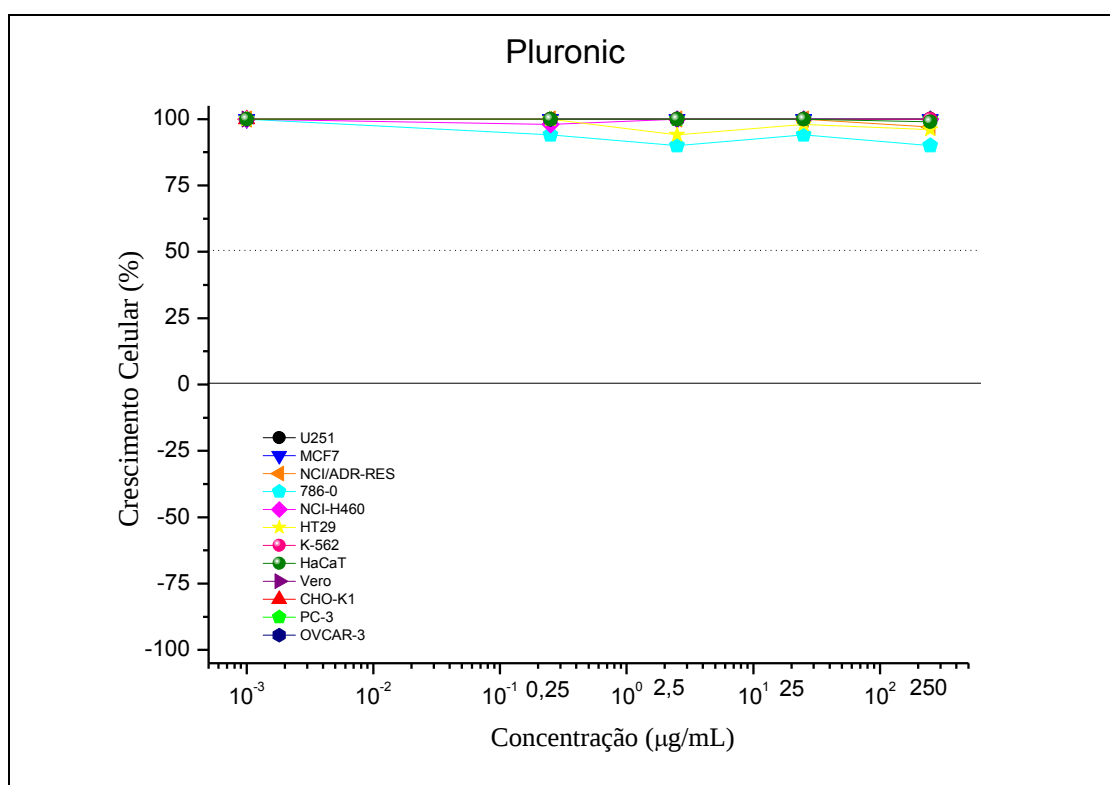
O aumento do pH da urina no CBNMI pode ser explicado pelo comprometimento renal (hidronefrose) detectado em todos os animais acometidos por essa neoplasia e isso ocasionou a neutralização da estrutura da formulação levando a agregação e precipitação do P-MAPA.

### 3.1.3 Avaliação e comparação da atividade antitumoral *in vitro* do Pluronic F 68

Em relação a uma possível atividade antitumoral do Pluronic F68 analisou-se que não houve inibição do crescimento celular em todas as linhagens de células tumorais testadas, o que nos dá suporte para afirmar que o Pluronic F68 não está interferindo nos nossos resultados de atividade antitumoral do P-MAPA (**Tabela 4 e Figura 4**).

**Tabela 4.** Valores de GI<sub>50</sub> (inibição de 50% crescimento) do estabilizante pluronic em cultura de células tumorais humanas (µg/mL).

|                     | U251 | MCF-7 | NCI-ADR-RES | 786-0 | NCI-460 | PC-3 | OVCAR-3 | HT-29 | K-562 | HaCat |
|---------------------|------|-------|-------------|-------|---------|------|---------|-------|-------|-------|
| <b>Pluronic F68</b> | >250 | >250  | >250        | >250  | >250    | >250 | >250    | >250  | >250  | >250  |



**Figura 4:** Gráficos da atividade anticâncer *in vitro* do pluronic F68 isolado em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração dos compostos. Ensaio da Sulforrodamina B após 48 h de exposição.

### **3.1.4 Análises de Western Blotting e Imunohistoquímica para os fatores indutores e reparadores de lesão celular (TLRs 2 e 4, Nrf2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, IL-6, P53, IFN- $\gamma$ , MMP-2, IRF3), balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF, HIF 1 $\alpha$ e Endostatina), proteínas de organização e distribuição estruturais do urotélio (UP, DSC, DSG) e para as enzimas formadoras de EROs (NOX1 e NOX4)**

Atualmente o tratamento mais eficaz para o CB é a imunoterapia com BCG, porém é sabido que esse tratamento provoca efeitos colaterais adversos e, dessa forma, torna-se de grande importância a elucidação e o aperfeiçoamento desta imunoterapia para o tratamento do CBNMI juntamente com a busca de novos agentes para a terapia intravesical. 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 (Durán e Nunes, 1990; Nunes e Durán, 2003).

Neste estudo, começamos analisando as proteínas envolvidas na organização estrutural do urotélio. Nessa vertente, é sabido que as UPs são proteínas transmembranares sintetizadas especificamente em células uroteliais superficiais diferenciadas terminalmente, as células em guarda-chuva (Zupancic, et al., 2011).

As UPs são os maiores componentes das unidades assimétricas de membrana (AUM) (Ogawa et al., 1999). Em processos de tumorigênese a expressão das UPs é reduzida. Zupancic et al. (2011) associaram a redução da expressão de uroplaquina III com um mal prognóstico em pacientes com carcinoma de bexiga urinária em estágio avançado, dessa forma as uroplaquinas são consideradas marcadores tumorais específicos para carcinomas de células transicionais.

A manutenção da expressão de UPIII pode indicar uma tentativa do tecido em remover as células danificadas da população em proliferação, e como tal pode ser considerado protetor (Ogawa et al., 1999).

Já, o aumento das junções adesivas como os desmossomos (DSC e DSG) podem indicar um mal prognóstico, pois moléculas de adesão podem regular a difusão, migração célula-célula e célula-matriz de adesão, o que favorece processos angiogênicos. Portanto, a inibição de adesão celular pode ser um possível mecanismo anti angiogênico (Weng et al., 2014).

Várias proteínas integrantes das junções já foram caracterizadas, porém é sabido que alterações em algumas junções podem contribuir na etiologia do processo de infecção

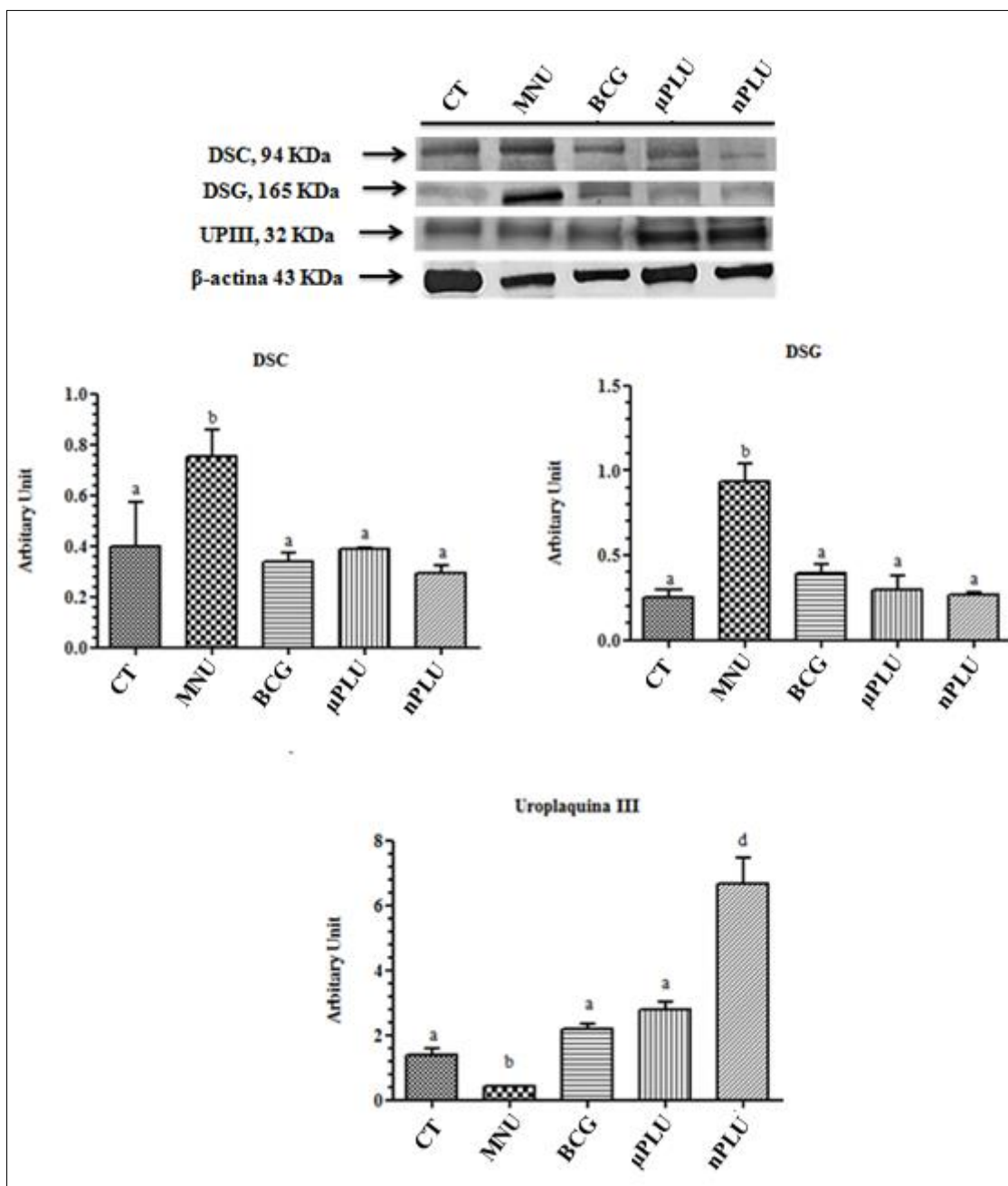
bacteriana intestinal, câncer e metástase, doenças dermatológicas de origem autoimune e outros.

Huang et al. (2013) verificam em carcinoma de células escamosas puro e carcinoma urotelial com diferenciação escamosa uma intensa imunoreatividade para DSG-3, indicando essa proteína como um importante biomarcador para a diferenciação escamosa.

Heijink et al. (2009) afirmam que as DSGs parecem ser altamente específicas para carcinoma de células escamosas em vários órgãos, porém a elucidação sobre o carcinoma urotelial ainda é limitado. No entanto, é sabido que diferentes isoformas desmossomais podem reduzir a adesão célula-célula, sendo esta uma característica de tumores malignos que favorecem a formação de metástases (Holthofer et. al., 2007). Também, Hayashi et al. (2011) verificaram que a DSC 2 apresentou intensa imunoreatividade no carcinoma urotelial com diferenciação escamosa.

Em relação a estas proteínas pertencentes ao urotélio, neste estudo observou-se uma redução significativa nos níveis proteicos de DSC e DSG nos grupos experimentais BCG,  $\mu$ PLU e nPLU (**Figura 5**).

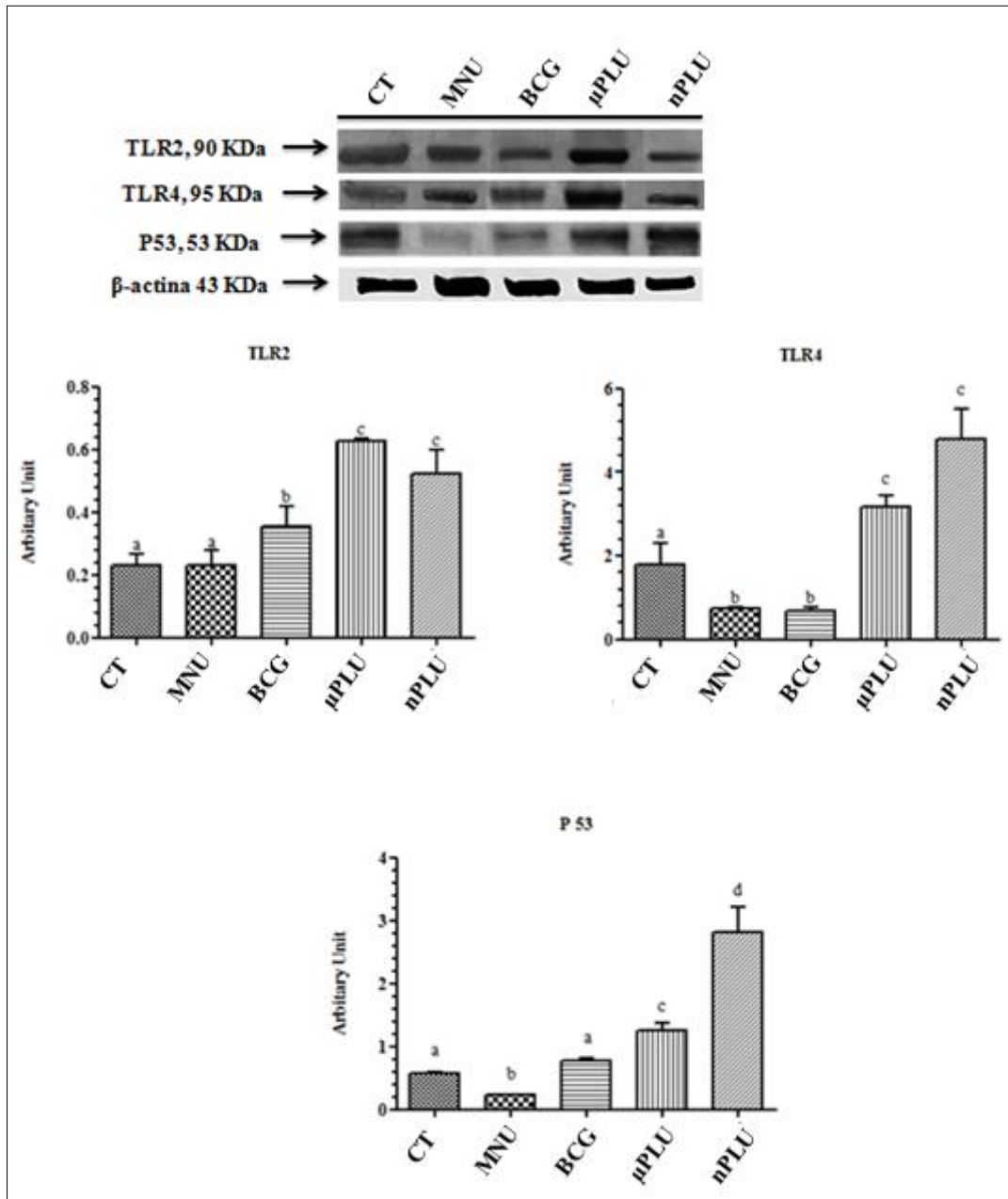
Entretanto, em relação a expressão de UP III analisou-se um significativo aumento dos níveis proteicos nos grupos de animais tratados com  $\mu$ PLU e nPLU em relação aos demais grupos. Este dado ressalta a eficiência do P-MAPA em manter a funcionalidade da barreira sangue urina o que permite a recuperação tecidual do urotélio da bexiga urinária.



**Figura 5:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas **DSC**, **DSG** e **UPIII** extraídas da bexiga urinária dos animais dos grupos CT, MNU, BCG e μPLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ( $n = 05$ )

Os resultados deste estudo corroboram com os resultados obtidos pelo grupo em 2012 (Fávaro et al., 2012) em relação a melhora do perfil imunológicos dos animais, contudo a dose foi reduzida 6,25 vezes e foram observados níveis protéicos significativamente maiores de TLR2, TLR4, p53 (**Figura 6**), TNFα, IFNγ e IRF3 (**Figura 7**) nos grupos μPLU e nPLU em relação ao grupo BCG, correlacionando com a regressão tumoral e caracterizando uma melhor

atuação do P-MAPA em relação a indução da expressão de fatores reparadores de lesão (Fávaro et al., 2012), garantindo o funcionamento do sistema imune inato e adaptativo.



**Figura 6:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas **TLR2**, **TLR4** e **P 53** extraídas da bexiga urinária dos animais dos grupos CT, MNU, BCG e μPLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ( $n= 05$ )

Dos reparadores de lesão mais estudados estão os TLRs estes compreendem uma família de moléculas que atuam como mediadores chave do sistema imune inato e adaptativo também conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PPR). Inicialmente descoberto em *Drosophila* (Anderson et al, 1985), esses receptores tem a capacidade de detectar

um vasto número de patógenos como fungos, bactérias e vírus além de outras moléculas que possam causar algum dano nos tecidos, esse processo é chamado de reconhecimento de patógenos (Christmas, 2010; Kaska, 2013).

A sinalização dos TLRs envolve uma série de proteínas e dentre eles podemos destacar as proteínas quinases, tais como IRAKs (IL 1R associado a quinases) e as proteínas mitógeno quinases ativadas (MAPKs), ocorre também a ativação de uma série de proteínas chamadas de citocinas estas, são segregadas da célula para recrutar e ativar outras células e, dessa forma iniciar uma resposta imune mais ampla (Christmas, 2010).

Existem duas vias de sinalização para a ativação desses receptores, a via clássica ou via MyD 88 (Fator de Diferenciação Mielóide 88) dependente (via canônica) que induz a expressão de citocinas inflamatórias através da ativação de NF- $\kappa$ B e a via MyD 88 independente (via não canônica) que induz a expressão de interferons (IFN) tipo I através da ativação de TRIF, e de outros fatores transcricionais envolvidos na imunodulação tais como IRF3 e ATF2/c jun (Servant et al., 2002). Entretanto, na via MyD 88 independente pode ocorrer um desvio levando a ativação de NF- $\kappa$ B e consequentemente de citocinas inflamatórias que podem contribuir para a apoptose.

Estudos sugerem que a expressão gênica dos TLRs pode ser controlada pelo gene supressor de tumor P 53 e respondem a este por via canônica e não canônica (Menendez et al., 2011).

O gene supressor de tumor P 53 orchestra a regulação transcricional dos elementos que controlam o ciclo celular (Afsharimoghaddam et al., 2016; Neto e Epstein, 2009). Levine (1997) ressalta que a perda de função em P53 é bem conhecida por causar alteração no ciclo celular em vias pró apoptóticas.

A mutação no gene p 53 representa a alteração genética mais comum em tumores malignos, estando associadas ao aumento da sensibilidade e resistência a agentes que causam danos ao DNA. (Fani et al., 1994; Fan et al., 1995; Levine, 1997). Hussain e Aktar (2013) também corroboram tais afirmações associando as alterações em P53 intracelular com o carcinoma *in situ* de alto grau e carcinoma músculo invasivo

Técnicas de Western Blotting tem sido eficientes na detecção de mutações em P53 nuclear, que é detectado em níveis elevados quando comparados com P53 selvagem (*wild type*), que é rapidamente degradada, ausente ou presentes em níveis reduzidos. (Esrig et al., 1994)

Outra molécula importante para a sobrevivência celular é o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Esta é uma citocina inflamatória que foi isolada de macrófagos ativados e células

T em 1984 (Idriss et al., 2000) e desde então tem sido objeto de diversas pesquisas. (Pennica et al., 1984; Phung et al., 2006; Durieux et al., 2015).

Como seu próprio nome diz, esta proteína tem a propriedade de induzir a rápida regressão de necrose em diversas formas de tumor. Através da ligação aos receptores de fator de necrose I a citotoxicidade do TNF  $\alpha$  acontece pela ativação de uma gama de proteínas que incluem G-proteína, fatores de transcrição, proteínas quinases, fosfolipases, proteínas mitocondriais e caspases (Idriss et al., 2000).

A relação do TNF  $\alpha$  com a produção de óxido nítrico (NO) também é observada, pois o TNF  $\alpha$  induz a produção de óxido nítrico sintase, que é a enzima que cataliza a reação da L-arginina responsável pela produção de óxido nítrico (Idriss et al., 2000)

O NO é um radical livre, que pode causar dano ao DNA através da geração de subprodutos tóxicos. Um dos produtos derivados da reação de óxido nítrico é a nitrotirosina que está presente em níveis elevados em condições patológicas.

Idriss (2000) explica que esta citotoxicidade mediada por TNF $\alpha$  e NO pode ser relacionada com a capacidade da célula tumoral em sofrer uma modificação no controle do ciclo celular através da nitrotirosinação da tubulina que o impede que a mesma polimerize e forme os microtúbulos (Idriss, 2000).

Os microtúbulos, existentes como heterodímeros poliméricos de subunidades de alfa e beta tubulina, são componentes essenciais do citoesqueleto e desempenham um papel importante em diversos processos do ciclo celular tais como divisão celular. Esta estrutura é essencial para a manutenção da viabilidade do ciclo celular (Phung, 2006).

Em síntese, o TNF  $\alpha$  induz a produção de NO sintase que eleva os níveis de Ca<sup>+</sup> que, por sua vez, causa a nitrosilação da  $\alpha$  tubulina resultando na morte celular. Entretanto, os efeitos necróticos do TNF $\alpha$  em células tumorais podem ser maiores na presença de interferon (IFN).

O IFN $\gamma$  é uma citocina pleiotrópica que atua como um importante modulador da resposta imune, apresentando atividade anti-proliferativa, anti-tumoral e anti-viral (Song, 2008). IFN $\gamma$  induz a expressão de NADPH oxidase e de iNOS em células mielóides. Por sua vez, iNOS, através da reação com arginina, gera NO e este tem ação tumoricida e citostática (Tamalidge, 2014).

A arginina é um aminoácido utilizado como substrato pela arginase, que está presente em altas concentrações no microambiente tumoral sendo assim, temos a competição pelo mesmo substrato por iNOS e arginase (Kursunel e Esendagli, 2016). O P MAPA apresenta 35,2% de arginina o que pode reduzir essa competição por substrato levando a um aumento nos níveis de NO o que pode auxiliar na morte celular tumoral.

Sabe-se também que um ilimitado número de aminoácidos essenciais como a L-arginina e o L-triptofano podem garantir o bom funcionamento das células T (Kursunel e Esendagli, 2016) melhorando a resposta imune. Estudos de Sikalidis (2015) indicam que as reduções desses aminoácidos tendem a reduzir a resposta das células T.

Dessa forma, o IFN $\gamma$  apresenta um papel complexo na carcinogênese podendo exercer efeitos anti metabólicos em uma ampla variedade de células tumorais e inibir a angiogênese (Bromberg et al., (1996), Buard et al., (1998)).

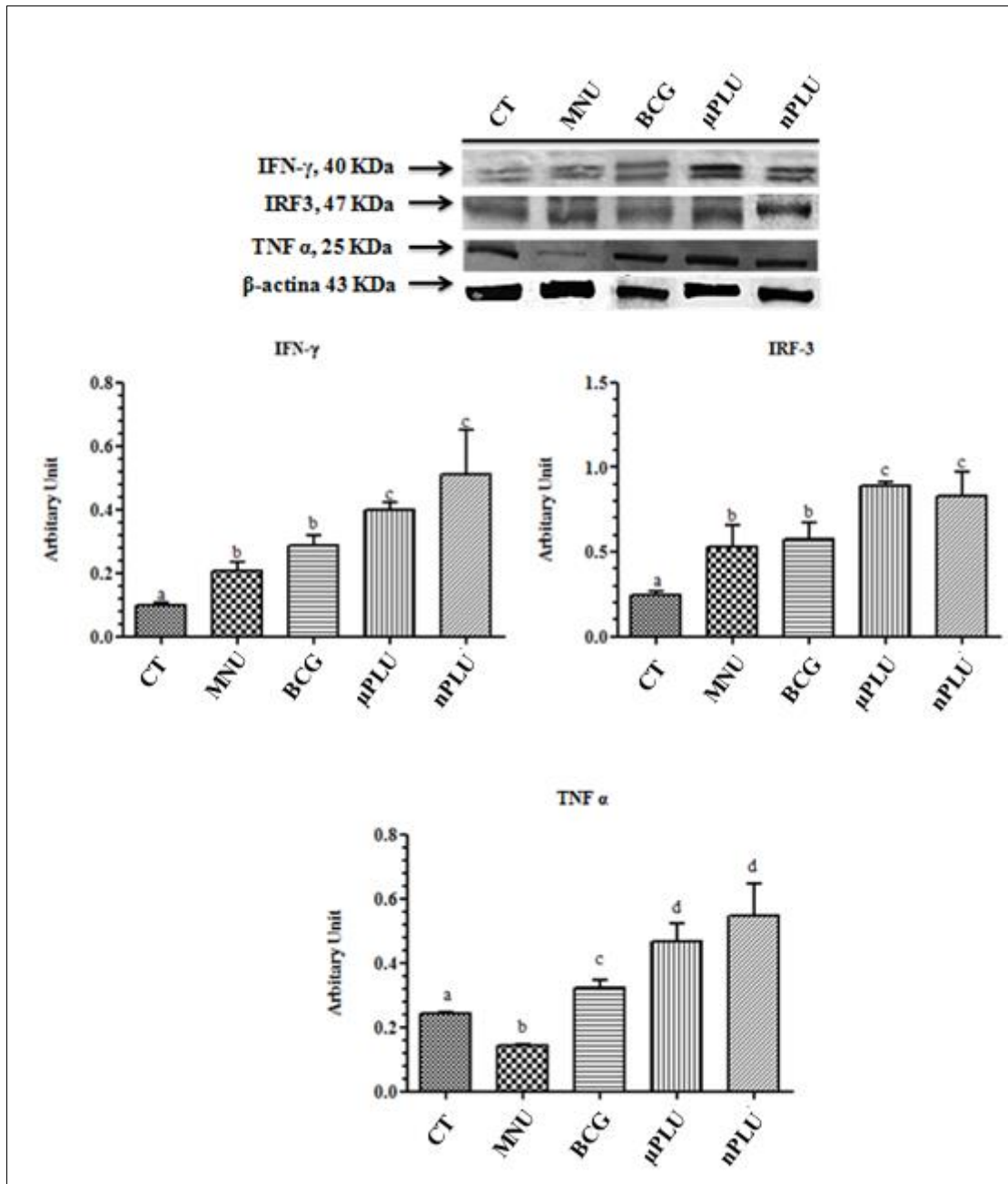
Pages et. al. (2002) e colaboradores observaram clinicamente que a instilação intravesical de IFN $\gamma$  inibe o crescimento do carcinoma de bexiga urinária bem como sua recorrência, o que é corroborado por Giannopoulos et al. (2003).

A ativação de interferon se dá através de IRF 3 (Fator Regulador de Interferon) sendo que esta é uma proteína de 55KDa presente em muitos tipos celulares. IRF 3 possui uma estrutura C terminal altamente condensada envolvida na associação de proteína-proteína e ativação de genes. Essa porção C terminal compreende um cluster com sítios fosfoaceptores e uma vez fosforilado IRF 3 heterodimeriza e transloca-se para o núcleo ativando proteínas como o IFN  $\gamma$  (Solis et al., 2006)

Ma (2003) ressalta que a expressão de IFN $\gamma$  pode estimular a expressão de macrófagos que, por sua vez, podem aumentar a expressão de receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), iNOS, TRAIL, moléculas de adesão celular e produção de IL 1, resultando na apoptose de células tumorais (Wang, 2003).

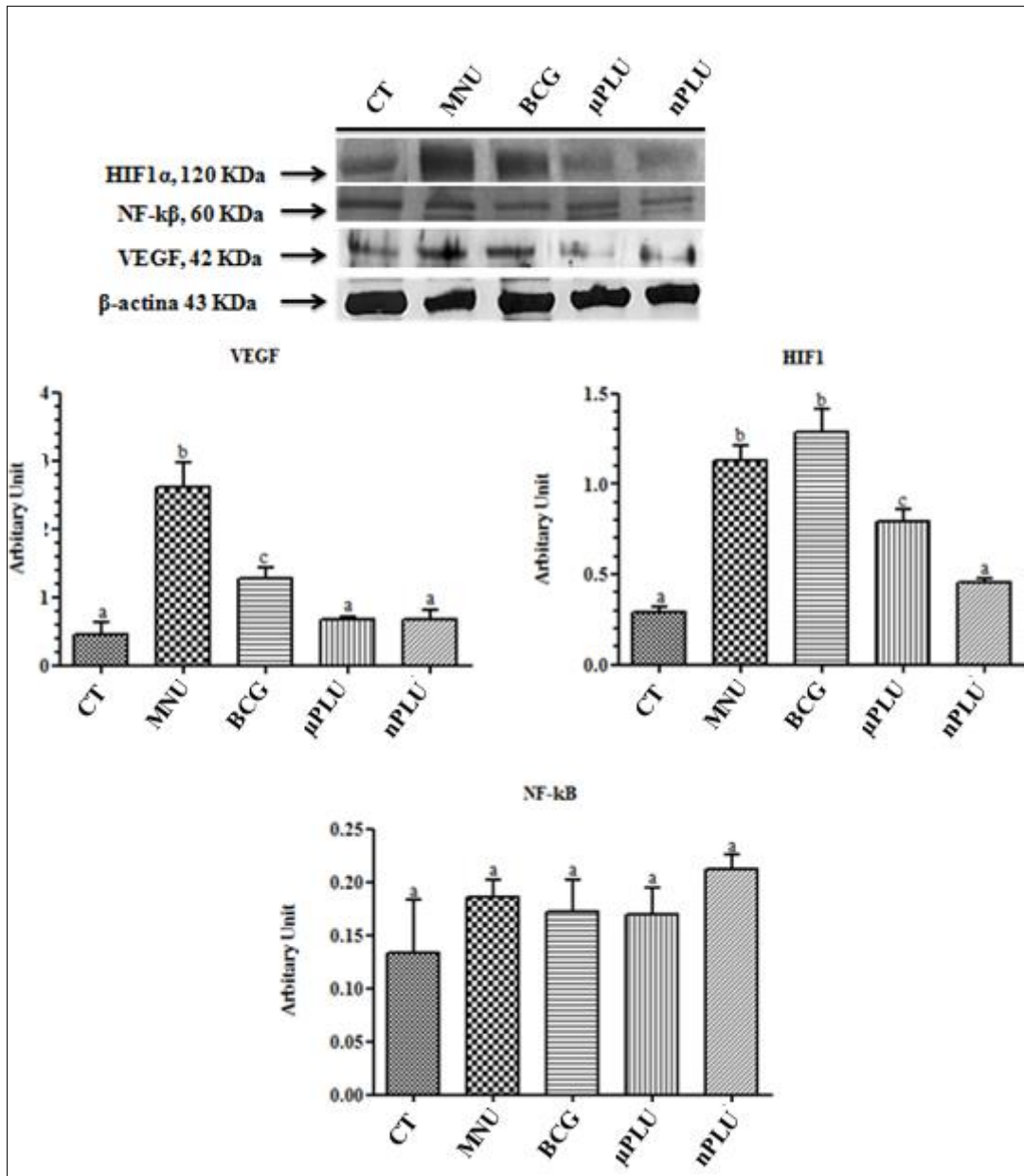
Macrófagos estão presentes em muitos tecidos e desempenham diversas funções incluindo remodelagem de tecidos, inflamação, imunidade, remoção de células apoptóticas e angiogênese. Dessa forma, os macrófagos podem atuar na defesa do seu hospedeiro contribuindo para a resposta imune inata e para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Solis et al., 2006)

Macrófagos ativados por IFN são um complemento atraente para terapias contra os cânceres convencionais (Bromberg et al., (1996), Buard et al., (1998)). Quando propriamente ativados os macrófagos exercem atividade antitumoral direta, ou seja, através da interação célula-célula, sendo capazes de reconhecer e levar a morte células tumorais.



**Figura 7:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas **IFN- $\gamma$** , **IRF-3** e **TNF $\alpha$**  extraídas da bexiga urinária dos animais dos grupos CT, MNU, BCG e  $\mu$ PLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*.  $\beta$ -actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=05$ ).

Outro ponto importante a ser considerado com termos de atividade anti tumoral é a inibição de processos angiogênicos e, neste estudo os animais dos grupos  $\mu$ PLU e nPLU apresentaram uma redução significativa dos níveis protéicos de VEGF, MMP2, IL6 e HIF1  $\alpha$  sendo que estas proteínas estão envolvidas intrinsicamente nos processos angiogênicos. Por outro lado observou-se um aumento significativo nos níveis de endostatina nos grupos  $\mu$ PLU e nPLU (Figuras 8 e 9).

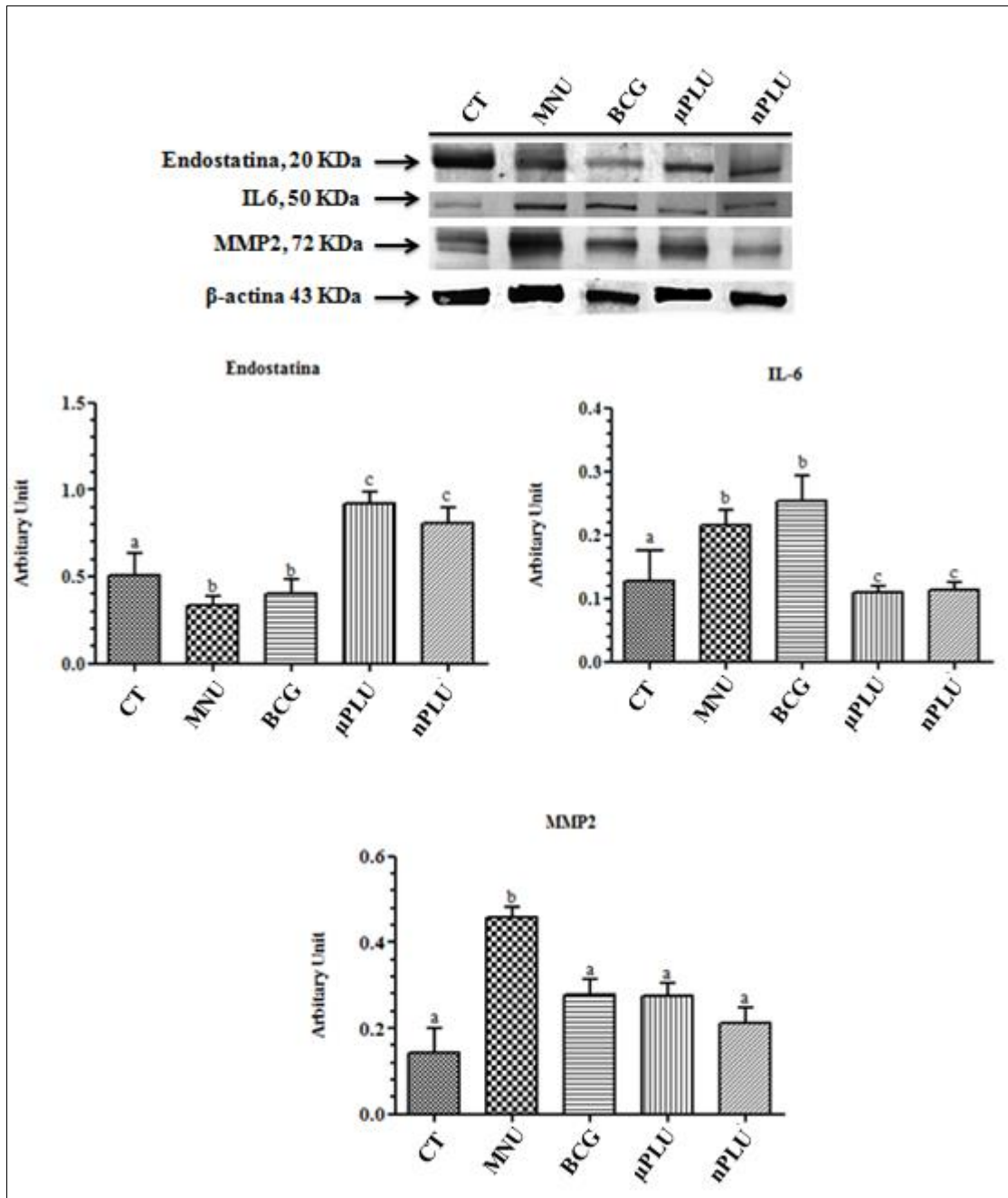


**Figura 8:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas **VEGF**, **HIF1α** e **NF-κB** extraídas da bexiga urinária dos CT, MNU, BCG e μPLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ( $n=05$ ).

A angiogênese está envolvida em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos sendo iniciada e regulada por várias citocinas e fatores de crescimento. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG) participa ativamente dos processos angiogênicos e tem sido descrito como um modificador da permeabilidade celular endotelial acarretando o surgimento de novos vasos em áreas com baixos níveis de oxigênios (hipóxia) para suprir as necessidades nutricionais das células tumorais.

A hipóxia tumoral é causada por um desequilíbrio entre o consumo e a oferta de oxigênio (Moon e Giaccia, 2015). A correlação entre a hipóxia e a expressão de HIF1 $\alpha$  e VEGF é bem conhecida. Page's e Pouysse'gur (2004) destacam que HIF1 $\alpha$  é o fator de transcrição dimérico ativado mais envolvido no estresse oxidativo. Os mesmos autores ressaltam que condições de hipóxia induzidas por HIF1 $\alpha$  é o ponto determinante para a expressão de VEGF.

Estudos de Wiecezorek et al. (2013) e de Kader et al. (2007) reportaram que genes codificantes de proteínas como as metaloproteinases de matriz (MMP) podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de bexiga. MMPs são uma família de endoproteinases zinco dependente que requerem a ativação catalítica através da outras MMPs ou proteases serina como plasmin e uroquinase e podem reduzir significativamente todos os componentes da matriz extracelular (EMC) como membrana basal, colágeno e fibronectina contribuindo para o processo de metástase, pois ocorre a retirada de toda barreira física, que impediria a invasão de células neoplásicas, através da degradação de macromoléculas da ECM (Grignon, 1996; Ramos, 1999).



**Figura 9:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas **Endostatina**, **IL-6** e **MMP2** extraídas da bexiga urinária dos grupos CT, MNU, BCG e μPLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ( $n=05$ )

Nesse contexto, vale ressaltar que a endostatina é um potente inibidor endógeno da angiogênese, sendo também um dos mais estudados e, conseqüentemente, um dos melhores caracterizados. A endostatina é um fragmento proteolítico derivada do colágeno XVIII, que pode inibir o crescimento endotelial pelo bloqueio da atividade catalítica de MMP2 e por reduzir a expressão de VEGF e induzindo a apoptose celular. (Sjin et al., 2005)

Estudos de Sjin et al. (2005) demonstraram que a atividade antitumoral da endostatina pode ser desempenhada pelos 27 resíduos terminais de sua sequência correspondente a NH<sub>2</sub> os quais contêm a ligação do átomo de Zinco, sendo responsável por toda atividade antitumoral da endostatina. Dos inibidores endógenos da angiogênese a endostatina tem o maior espectro de atividade antitumoral, sendo também a droga menos tóxica para camundongos e seres humanos (Folkman, 2006).

Em relação às proteínas angiogênicas no tratamento com BCG, os níveis protéicos de VEGF continuaram elevados em relação ao tratamento com P-MAPA micro e nano pluronic. Os elevados níveis de VEGF e a redução dos níveis de endostatina podem se correlacionar com a desregulação do NF-κB. Dolcet et al. (2005) demonstraram que a desregulação do NF-κB inibe a apoptose, aumenta a proliferação celular e promove a angiogênese também, os estudos de Pikarsky (2004), indicaram, que o NF-κB é essencial para a promoção do câncer associado a inflamação, e é, conseqüentemente, um alvo potencial para a prevenção do câncer, em doenças inflamatórias crônicas. Entretanto, neste estudo não foram observadas diferenças significativas para os níveis proteicos de NF-κB nos grupos experimentais (**Figura 8**).

O NF-κB e a proteína de ativação a (AP-1) são a chave dos fatores de transcrição que orquestram a expressão de muitos genes envolvidos nos processos inflamatórios e conseqüentemente no câncer (Giri, 2010). O NF-κB controla a expressão de todas as mais importantes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, muitos fatores de crescimento angiogênicos, TNF α, iNOS, COX-2, ICAM-1, VCAM-1, E-seletina e as vias de proliferação e sobrevivência celular (Kevin e Nikolaus (2007), Karin (2006)).

Similarmente AP-1 regula a atividade da IL-2 (IL-2), IL-3, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), MMPs, collagenase e estromelisina. Muitos outros genes pró-inflamatórios também são conhecidas por terem sítios de ligação de NF-κB e AP-1 (Eferl e Wagner, 2003). A ativação de NF-κB também pode induzir a produção pelos macrófagos de IL12, IL 23, IL 28 e IL 27 que induzem a síntese de IFNγ pelos linfócitos T (Teixeira, et al., 2007).

Sabe-se que o BCG é um bacilo atenuado de *Mycobacterium bovis* e comporta-se como um ativador do sistema imune através da regulação da expressão de citocinas e ativação de células efetoras do sistema imune (Pang e Catto, 2013). Para o paciente que é submetido a esse tratamento o regime de manutenção ideal ainda é desconhecido, contudo uma abordagem comum é de 27 doses ao longo de 3 anos (Pang e Catto, 2013).

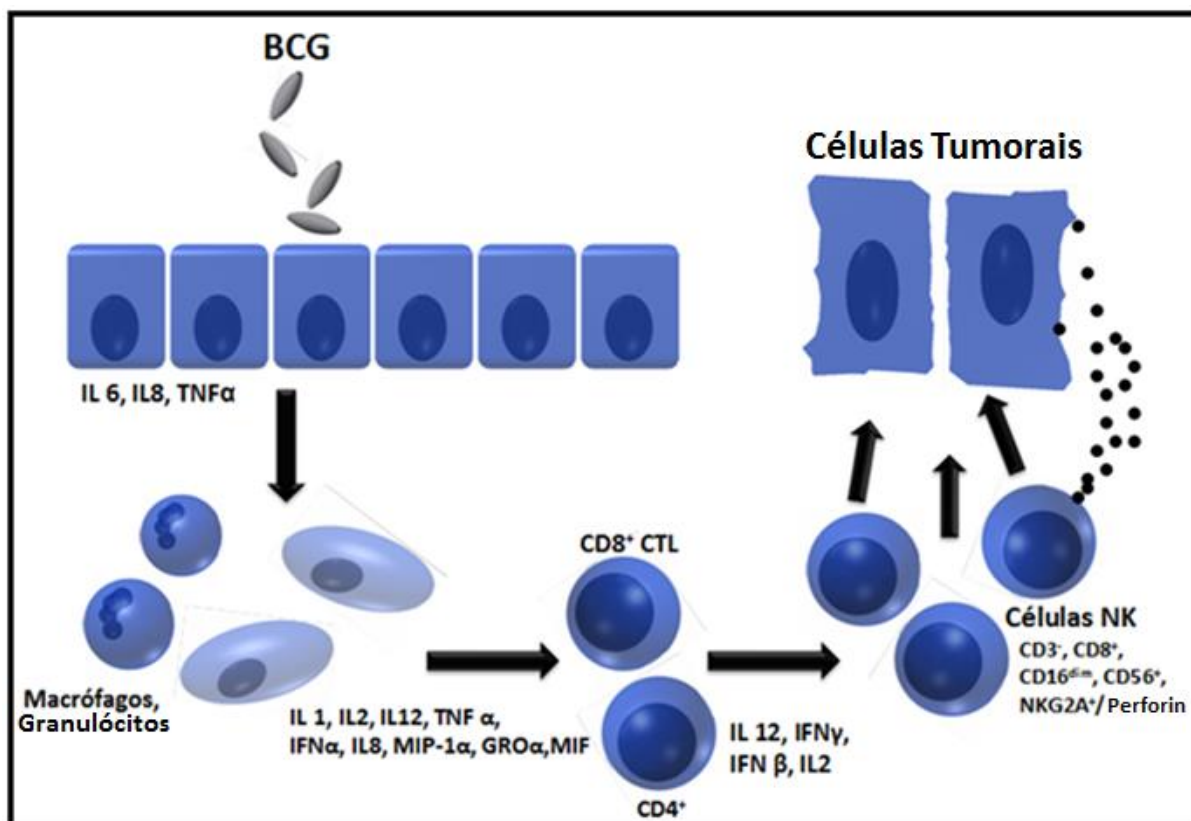
A administração intravesical de BCG exerce efeito antineoplásico no CBNMI, pois esse agente induz a uma resposta sistêmica do complexo imune compreendendo os

componentes humoral e celular (Bohle e Brandau, 2003). BCG também exerce um efeito farmacogenético direto sobre as células do carcinoma urotelial (Bohle e Brandau, 2003; DiPaola e Lattime, 2007). Ainda, outros autores demonstraram o efeito antiproliferativo direto de BCG em células do carcinoma urotelial (Seow et al., 2002; Chen et al., 2005). Possíveis mecanismos contribuem para esse efeito biológico, os quais incluem a parada do ciclo celular e/ ou apoptose, o que é demonstrado por Chen et al. (2005) onde a interrupção do ciclo celular se dá na fase G1/ S quando células do carcinoma urotelial foram expostas ao BCG.

Além disso, a imunoterapia intravesical com BCG induz a uma intensa resposta inflamatória no urotélio da bexiga urinária caracterizada por ativação de linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias, IL1, IL6, IL8 (Pavlovich et al., 2000; Brandau e Suttman, 2007). Em concordância com essas informações, neste estudo observou-se que os níveis protéicos para IL-6 foram significativamente maiores nos grupos MNU e BCG em relação aos grupos  $\mu$ PLU e Nplu (**Figura 9**)

IL6 é uma citocina pleiotrópica imunorreguladora que desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, tais como inflamação, metabolismo ósseo, síntese de proteína C-reativa (CRP), e carcinogênese. (Diehl e Rincón, 2002; Asschert et al., 1999). IL6 é constituída por 184 resíduos de aminoácidos e está envolvida na modulação do crescimento e diferenciação em vários tumores malignos ainda, está associada com a progressão de vários tumores sólidos e várias neoplasias hematopoiéticas (Miyajima et al., 1992).

Estudos de Pavlovich et al. (2000) demonstraram que a administração intravesical de BCG induz diferentes mediadores como o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e a proteína induzível de interferon-10 (IP-10), os quais exercem potente efeito antitumoral e antiangiogênico. De acordo com Schamhart et al. (2000) e Brandau e Suttman (2007), poucas horas após a instilação de BCG, inicia-se uma complexa cascata de eventos inflamatórios iniciada por um grande número de neutrófilos seguida por monócitos/macrófagos que se infiltram na parede da bexiga (**Figura 10**), 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 o resultado da terapia é alvo de investigação (Schamhart et al., 2000).



**Figura 10:** Mecanismo de ação de imunológica envolvido na imunoterapia com BCG no tratamento do câncer de bexiga não músculo invasivo.

Atualmente, além de elucidar a cascata inflamatória após a instilação de BCG, houve um grande progresso na compreensão da interação molecular direta do BCG com células do sistema imunológico do hospedeiro. 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 TLR, em células do sistema imunológico do hospedeiro (Janeway, 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 projeto, pois observou-se que os níveis protéicos para TLR2 foram significativamente mais elevados no grupo BCG em se comparando com TLR 4.

Atividade antitumoral também pode ser observada na translocação do fator nuclear eritróide 2 (NRF2). O NRF2 é um fator de transcrição pertencente à família CAP N Collar (CNC) e contém o domínio basic leucine zipper (bzip) altamente conservado o que lhe confere ligação ao DNA. Primariamente localizado no citoplasma o NRF2 é maior fator de transcrição regulando cerca de 100 a 200 genes alvo controlando respostas celulares oxidativas e de estresse eletrolítico (Moon e Giaccia, 2015).

Uma vez translocado para o núcleo o NRF2 heterodimeriza em pequenas proteínas MAF (Moon e Giaccia, 2015). MAF foi primeiramente descrita como um oncogene viral, vMAF (fibrossarcoma músculo aponeurótico) e contém domínio de ligação de base com o DNA e o domínio leucine zipper de dimerização que interage com NRF2 e ativa genes de resposta antioxidante através de vias de receptores antioxidante (ARE) mediando essa resposta, por exemplo através de glutathione peroxidase, superóxido dismutase, metalotioneína, tireodoxina e tireodoxina redutase (Moran, 2002).

A ligação de NRF2 a genes alvos de ARE pode ser benéfica para detoxicação carcinogênica em células normais o que torna o NRF2 um contra-regulador da formação de EROs (Hayden, 2014). Os dados deste estudo corroboram tal afirmação, pois se observou aumento dos níveis protéicos de NRF2 e redução dos níveis protéicos de NOX 1 e 4 nos grupos  $\mu$ PLU e nPLU (**Figura 11**).

Níveis fisiológicos de EROs são importantes para a proliferação celular normal, porém em processos de tumorigênese é observado o aumento da hipóxia, esse evento resulta na produção mitocondrial excessiva de EROs que conduz a ativação de proteína mitógeno quinase ativada (MAPK), incluindo a cascata de fosforilação de JNK (cJun N-terminal quinase), p 38 e ERK (Sancho e Fabregat, 2010; Bedard e Krause, 2007).

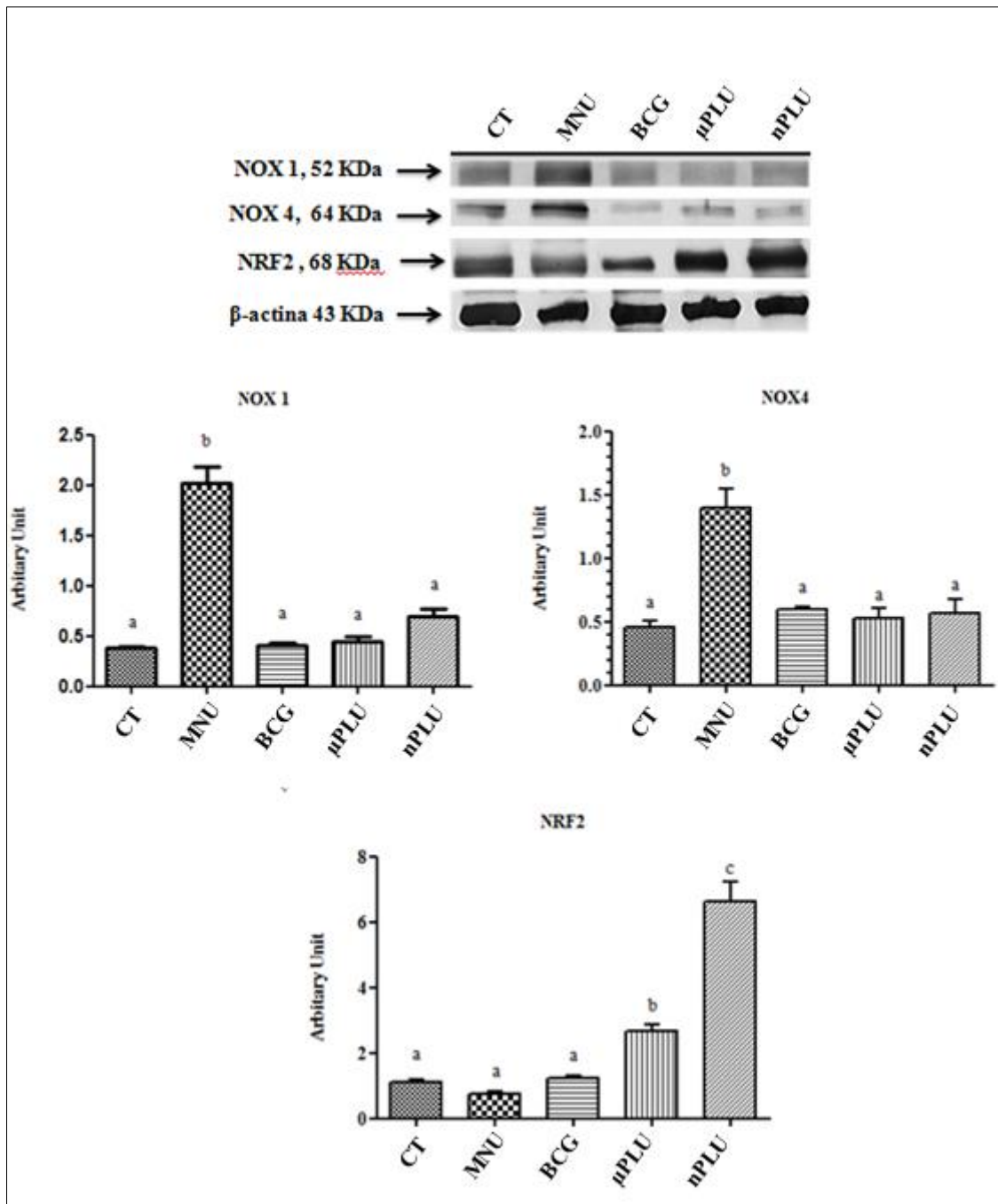
A geração fisiológica de EROs pode ocorrer como um produto secundário de reações biológicas ou como uma função enzimática principal.

Os NOX são subunidades constituintes das NADPH oxidases o qual foi o primeiro exemplo de sistema identificado por gerar EROs não como um produto secundário (Bedard e Kause, 2007). Todos os membros da família NOX são proteínas transmembranares transportadores de elétrons através das membranas biológicas para a redução do oxigênio para superóxido (Weaver e Fishwick, 2013).

Estudos tem observado a expressão de NOX em sistema vascular e levantam a hipótese de envolvimento deste com fatores de crescimento acelerando o crescimento tumoral. Estudos in vitro sugerem o envolvimento de NOX1 e 4 na proliferação de células de músculo liso (Bedard e Kause, 2007).

Dessa maneira, EROs estão envolvidos nos eventos de iniciação, progressão e manutenção tumoral. Nossos dados demonstraram que os animais dos grupos  $\mu$ PLU e

nPLU e BCG apresentaram níveis significativamente menores de NOX 1 e 4 em relação ao grupo MNU, entretanto somente os grupos  $\mu$ PLU e nPLU apresentaram um aumento significativo nos níveis de NRF2 sendo este um contrarregulador de NOX 1 e 4



**Figura 11:** Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas NOX 1, NOX 4 e NRF2 extraídas da bexiga urinária dos animais dos grupos CT, MNU, BCG e  $\mu$ PLU e nPLU. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*.  $\beta$ -actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n= 05)

Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o P-MAPA utilizado intravesicalmente na dose de 5 mg/Kg (concentração aproximada de 6,25 mg/mL) produziu um importante efeito antitumoral no CBNMI (Fávaro et al., 2012). No presente trabalho, o P-MAPA foi administrado na dose de 1 mg/mL, ou seja, uma redução da dose de 6,25 vezes em relação à dose utilizada inicialmente. Mesmo com essa redução, a estabilização com Pluronic dos micro e nanocristais de P-MAPA garantiu o mesmo efeito antitumoral desse fármaco observado na dose de 6,25 mg/mL.

Considerando em conjunto, os presentes resultados indicam que a nanonização do P-MAPA estabilizada com Pluronic pode ser uma promissora alternativa terapêutica para o CBNMI.

## 4. Conclusão

As formulações de P-MAPA micro Pluronic e P-MAPA nano Pluronic foram equivalentes no efeito biológico restaurando e garantindo a preservação das características urotelias (DSC, DSG e UP) mantendo a funcionalidade da barreira sangue-urina.

Contudo, as análises moleculares demonstraram que a imunoterapia com P-MAPA nano Pluronic e P-MAPA micro Pluronic promoveu ativação equivalente do sistema imune inato e adaptativo mediada por TLRs 2 e 4 em relação ao BCG, resultando no aumento da via de sinalização para interferons, desacelerando o processo de angiogênese e reduzindo a atuação de enzimas formadoras de EROS (NOX 1 e 4) culminando com significativa regressão do CBNMI.

A utilização da quitosana como estabilizante para nanonização de produtos destinados ao tratamento intravesical de câncer de bexiga mostrou-se experimentalmente não efetiva, devido à influência adversa do PH urinário na estabilidade da molécula de quitosana. Consequentemente, a formulação do P-MAPA micro quitosana e P-MAPA nano quitosana não se mostraram efetivas no tratamento intravesical de câncer de bexiga no modelo animal.

A utilização do Pluronic como estabilizante para o desenvolvimento de formulações de compostos terapêuticos para o tratamento intravesical do CBNMI, mostrou-se efetiva através da proteção o produto contra alteração ou perdas pela variação do pH urinário. O Pluronic também não apresentou atividade antiproliferativa mostrando que os dados apresentados não estão sofrendo interferência deste estabilizante o que, nos leva a sugerir que o P-MAPA apresenta características relevantes como potencial fármaco para o tratamento adjuvante do câncer de bexiga.

Para um efeito biológico equivalente no tratamento do CBNMI, o P-MAPA micro pluronic e o P-MAPA nano pluronic, permitiram uma mesma redução na quantidade de composto ativo utilizado em relação a dosagem anteriormente utilizada. No entanto, a nanonização do P-MAPA utilizando Pluronic permitiu a estabilização do composto mantendo suas características químicas e biológicas originais.

## 5. Referências Bibliográficas

- ASKELAND, E.J.; NEWTON, M.R.; O'DONNELL, M.A.; LUO, Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv. Urol.*, v.2012, p.1-12, 2012.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, v.4, p.499–511, 2004.
- ASSCHERT, J.G.; VELLENGA, E.; RUITERS, M. H.; DE VRIES, E. G. Regulation of spontaneous and TNF/IFN-induced IL-6 expression in two human ovarian-carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, v. 82, p. 244-249, 1999.
- AL HUSSAIN, T. O.; AKHTAR, M. Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv. Anat. Pathol.*, v. 20, p. 53-60, 2013.
- BAYRAKTAR, N.; KILIC, S.; BAYRAKTAR, M.R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in cancerous bladder tissue and their relation with bacterial infection: a controlled clinical study. *J. Clin. Lab. Anal.*; v.24, p.25-30, 2010.
- BROWN, N.S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress, its effects on the growth, metastatic potential, and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.*; v.3, p.323–327, 2001.
- BROWN, J.A.; DORFMAN, D.M.; MA, F.R.; SULLIVAN, E.L.; MUNOZ, O.; WOOD, C.R. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.*; v.170, p.1257–1266, 2003.
- BROWN-BORG, H.M.; BODE, A.M.; BARTKE, A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone Levels: Potencial relationship in the aging process. *Endocrine.*; v.11, p.41-48, 1999.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*; v.72, p. 248-254, 1976.
- BROMBERG, J. F.; HORVATH, C. M.; WEN, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J. E. JR. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p. 7673–7678, 1996.
- BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 83, p. 91-97, 2003.
- BUARD, A.; VIVO, C.; MONNET, I.; BOUTIN, C.; PILATTE, Y.; JAURAND M. C. Human malignant mesothelioma cell growth: activation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 1 $\alpha$  for inhibition by interferon- $\gamma$ . *Cancer Res.*, v. 58, p. 840-847, 1998.
- BEDARD, K; KRAUSE, K. H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 245–313, 2007.

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

CHANG, Z.; CHOON, A.; FRIEDL, A. Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding. *Am. J. Pathol.*; v.155, p.71–76, 1999.

CHEN, F.; ZHANG, G.; IWAMOTO, Y.; SEE, W.A. BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. *BMC Urol.*, v.5, p.8, 2005.

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

CHRISTMAS, P. Toll-Like Receptors: Sensors that detect infection. *Nature Educ.* v.3, p.85-89, 2010.

CALFA, C. I.; ROSENBLATT, J. D.; CHO, H. M.; WEBSTER, K.; SHIN, S. U. Antibodies and antibody-fusion proteins as anti-angiogenic, anti-tumor agents. *Update on cancer therapeutics*, v.1, p. 159–173, 2006.

DAO, D. N.; KREMER, L.; GUE´RARDEL, Y.; MOLANO, A.; JACOBS, W. R. J.; PORCELLI, S. A.; BRIKEN, V. Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 2067–2074, 2004.

DIPAOLA, R.S.; LATTIME, E.C. *Bacillus Calmette-Guerin* mechanism of action: the role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy. *J. Urol.*, v.178, p.1840-1841, 2007.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.*, v. 39, p. 531-536, 2002.

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS, G. X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.*, v.446, p.475-482, 2005.

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

DURIEUX P.; ETCHEPAREBORDE, S.; FRITZ, D.; ROSOLEN S.G. Tumor necrosis factor- $\alpha$  concentration in the aqueous humor of healthy and diseased dogs: A preliminary pilot study. *J. Français d'Ophtalmologie*, v. 38, p. 288-294, 2015.

EFERL, R.; WAGNER, E. Ap-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, p. 859-868, 2003.

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

EBLIN, K.E.; HAU, A.M.; JENSEN, T.J. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: acute studies. *Toxicology*, v.250, p.47-54, 2008.

ELSBACH, P.; WEISS, P. A revaluation of the roles of O<sub>2</sub>- dependent and O<sub>2</sub>- independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev. Infect. Dis.*, v.5, p.843-853, 1983.

ERILL, N.; COLOMER, A.; VERDÚ, M. Genetic and immunophenotype analyses of TP53 in bladder cancer: TP53 alterations are associated with tumor progression. *Diagn. Mol. Pathol.*, v.13, p.217-23, 2004.

FAN, S.; EL-DEIRY, W. S.; BAE, I.; FREEMAN, J.; JONDLE, D.; BHATIA, K.; FORNACE, A. J. JR.; MAGRATH, I.; KOHN, K. W.; O'CONNOR, P. M. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res.*, v. 54, p. 5824-5830, 1994.

FAN, S.; SMITH, M. L.; RIVET, D. J. 2ND.; DUBA, D.; ZHAN, Q.; KOHN, K. W.; FORNACE, A. J. JR.; O'CONNOR, P. M. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res.*, v. 55, p. 1649-1654, 1995.

FÁVARO, W.J.; BILLIS, A.; NUNES, I.S.; DURAN, N. New immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): effects of immunomodulator P-MAPA. *J. Urol.*, v.187 (Suplemento), p. e231, 2012.

FÁVARO, W. J.; NUNES, O. S.; SEIVA, F. R. F.; 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. Agents and Cancer*, v. 7, p.1-14, 2012.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell. Res.*, v. 312, p. 594– 607, 2006.

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, p.6658-6669, 2010.

GARCIA, P. V.; SEIVA, F. R.; CARNIATO, A. P.; MELLO JÚNIOR, W.; DURAN, N.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, A. G.; ROMIH, R.; NUNES, I. S.; NUNES, O. S.; FÁVARO, W. J. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*, v. 16, p. 422-439, 2016.

GARCIA, P. V.; APOLINÁRIO, L. M.; BÖCKELMANN, P. K.; NUNES, I. S.; DURAN, N.; FÁVARO, W. J. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v.5, p. 4427-4443, 2015.

GIRI, R. S.; THAKE, H. M.; GIORDANO, T.; WILLIAMS, J.; ROGERS, D.; VASU, K. K.; SUDARSANAM, V. Design, synthesis and evaluation of novel 2-thiophen-5-yl-3H-

quinazolin-4-one analogues as inhibitors of transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 mediated transcriptional activation: Their possible utilization as anti-inflammatory and anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 18, p. 2796–2808, 2010.

GIANNOPOULOS, A.; CONSTANTINIDES, C.; FOKAEAS, E.; STRAVODIMOS, C.; GIANNOPOULOU, M.; KYROUDI, A.; GOUNARIS, A.; The immunomodulating effect of interferon-gamma intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence, *Clin. Cancer Res.*, v. 9, p.5550–5558, 2003.

GRIGNON, D. J.; SAKR W.; TOTH M.; RAVERY V.; ANGULO J. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.*, v.56, p. 1654-9, 1996.

GROTE, K.; SCHÜTT, H.; SCHIEFFER, B. Toll-like receptors in angiogenesis *Sci. World J.*, v.11, p 981–991, 2011.

HAYDEN, A.; DOUGLAS, J.; SOMMERLAD, M.; ANDREWS, L.; GOULD, K.; HUSSAIN, S.; THOMAS, G. J.; PACKHAM, G.; CRABB, S. J. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urol. Oncol.*, v. 32, p. 806-814, 2014.

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, p.2314-2330, 2007.

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

HAO, G.; DAWSON, J.; LEE, G.; LONGLEY, R. Zinc supplementation protects human endostatin Fc fusion against proteolytic degradation during cell culture. *Protein Express Purif.*, v. 93, p. 18-22, 2014.

HEIJINK, C. D. S.; KOSARI, F.; AUBRY, M. C.; CARON, B. L.; SUN, Z.; YANG, P.; VASMATZIS, G. The role of desmoglein-3 in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung. *Am. J. Pathol.*, v. 174, p. 1629–1637, 2009.

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, p.139–152, 1972.

HOLTHÖFER, B.; WINDOFFER, R.; TROYANOVSKY, S.; LEUBE, R. E. Structure and function of desmosomes. *Int. Rev. Cytol.*, v. 264, p. 65-163, 2007.

HUANG, W.; SEAN R. WILLIAMSON, S. R.; RAO, Q.; BELTRAN, A. L.; MONTIRONI, R.; EBLE, J. N.; GRIGNON, D. J.; IDREES, M. T.; EMERSON, R. E.; ZHOU, X. J.; ZHANG, S.; BALDRIDGE, L. A.; HAHN, N. M.; WANG, M.; KOCH, M. O.; CHENG, L. Novel markers of squamous differentiation in the urinary bladder. *Hum. Pathol.*, v. 44, p. 1989–1997, 2013.

HUSSAIN TO, AKHTAR M. Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv. Anat. Pathol.*, v.20, p.53–60, 2013.

ICHIMURA, Y.; HABUCHI, T.; TSUCHIYA, N. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J. Urol.*, v.172, p.728-732, 2004.

IDRISS, H. T. Do TNF- $\alpha$ -insensitive cancer cells escape  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination? *Nitric Oxide*, v. 4, p.1-3, 2000.

IIDA, K.; ITOH, K.; KUMAGAI, Y. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, v.64, p.6424–6431, 2004.

IIDA, K.; ITOH, K.; MAHER, J.M. Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis.*, v.28, p.2398–2403, 2007.

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

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

KIER A. B. Plasma membrane properties of cultured local LM cell tumors and metastases from athymic (nude) mice. *Cancer Lett.*, v.50, p.19–30, 1990.

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

KIMBRO, K.S.; SIMONS, J.W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, v.13, p739–749, 2006.

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

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

KADER AK, LIU J, SHAO L, DINNEY CP, LIN J, WANG Y, GU, J.; GROSSMAN, H. B.; WU, X. Matrix metalloproteinase polymorphisms are associated with bladder cancer invasiveness. *Clin. Cancer Res.*, v. 13, p.2614-2620, 2007

KEVIN, C.; NIKOLAUS, R. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.*, v. 8, p.93-103, 2007.

KARIN, M. Nuclear factor-kB in cancer development and progression. *Nature*, v. 441, p.431-436, 2006.

KURSUNEL, M. A.; ESENDAGLI, G. The untold story of IFN- $\gamma$  in cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews in press, Corrected Proof*, 2016.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.*, v. 88, p.323-331, 1997.

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, p.2625–2632, 2005.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MAA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol. Life Sci.*, v.60, p.2334–2346, 2003.

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

MIYAJIMA, A.; KITAMURA, T.; HARADA, N.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 10, p.295-331, 1992.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GOODRICH, M. G.; CAMPBELL, H.; MAVO, J.; BOVD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 83, p.757-766, 1991.

MOON, E. J.; GIACCIA, A. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment, *Free Radic. Biol. Med.*, v. 79, p.292-299, 2015.

MUAGBE, C.; RAVEN, P.A.; FAZLI, L.; BAKER, J.H.E.; JACKSON, J.K.; LIGGINS, R.T.; SO, A.I.; GLEAVE, M.E; BROOKS, D.E.; BURT, H.M. Tissue uptake of docetaxel loaded hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols and their effects on the morphology of the bladder urothelium. *Biomaterials*, v. 33, p.692-703, 2012.

NETO, G. J.; EPSTEIN, J. Immunohistology of the prostate, bladder, kidney and testis in Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications/ edited by David J Dabbs, 3 ed Saunders, *Elsevier*, 2009.

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.

OGAWA, K.; ST JOHN, M.; LUIZA DE OLIVEIRA, M.; ARNOLD, L.; SHIRAI, T.; SUN, T.T.; COHEN, S.M. Comparison of uroplakin expression during urothelial carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats and mice. *Toxicol. Pathol.*, v.27, p.645–651, 1999.

OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem. Toxicol.*, v.33, p.747–755, 1995.

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

PIKARSKY, E.; PORAT, R.M.; STEIN, I. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, v.431, p. 461–466, 2004.

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.

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- $\alpha$ -dependent mechanism. *Carcinogenesis*, v.29, p. 1334–1342, 2008.

PENNICA, D.; NEDWIN, G. E.; HAYFICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M. A.; KOHR, W. J.; AGGARWAL, B. B.; GOEDDEL, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, v. 312, p.724–729, 1984.

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

PAGE`S, G.; POUYSSE`GUR, J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.*, v. 65, p. 564– 573, 2004.

PAGES, F.; LEBEL, S. B.; VIEILLEFOND, A.; DENEUX, L.; CAMBILLAU, M.; SOUBRANE, O.; DEBRE, B.; TARDY, D.; LEMONNE, J. L.; ABASTADO, J.P.; FRIDMAN, W. H.; THIOUNN, N. Local immunostimulation induced by intravesical administration of autologous interferon-gamma-activated macrophages in patients with superficial bladder cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, v.127, p. 303–309, 2002.

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, p.529–542, 2004.

PHUNG, A. D.; SOUCEK, K.; KUBALA, L. HARPER, R. W.; BULINSKI, J. C.; EISERICH, J. P. Posttranslational nitrotyrosination of  $\alpha$ -tubulin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 85, p. 1241–1252, 2006.

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

RAMOS, S. N, HAHN, D. E.; SIPLEY, J.; NAGASE H.; FRENCH D. L.; QUIGLEY J. P. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 13066–76, 1999.

RAMACHANDRAN, S.; NANDHAKUMAR, S.; DHANARAJU, M. D. Formulation and Characterization of Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Biodegradable Microspheres Loaded with Famotidine. *Trop. J. Pharm. Res.*, v. 10, p. 309–316, 2011.

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, p. 499-505, 2010.

REIS, L.O.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; CAGNON, V.H.; FÁVARO, W.J. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.*, v.187, p. 438-445, 2012.

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

SANCHO, P.; FABREGAT, I. NADPH oxidase NOX1 controls autocrine growth of liver tumor cells through up-regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 24815-24824, 2010.

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

SIKALIDIS, A. K. Amino acids and immune response: a role for cysteine, glutamine, phenylalanine, tryptophan and arginine in T-cell function and cancer? *Pathol. Oncol. Res.*, v. 21, p. 9-17, 2015.

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

SEOW, S.W.; RAHMAT, J.N.; MOHAMED, A.A.; MAHENDRAN, R.; LEE, Y.K.; BAY, B.H. *Lactobacillus species* is more cytotoxic to human bladder cancer cells than *Mycobacterium bovis* (*Bacillus Calmette-Guerin*). *J. Urol.*, v.168, p.2236-2239, 2002.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, v.3, p.721-732, 2003.

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, p.16, 2000.

SHERBET G.V. Membrane fluidity and cancer metastasis. *Exp. Cell Biol.*, v.57, p.198– 205, 1989.

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

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, p.6668-6741, 1990.

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

SJIN, R. M. T. T.; FAINARO, R. S.; BIRSNER, A. E.; RAMANUJAM, V. M. S.; FOLKMAN, J.; JAVAHERIAN, K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity. *Cancer Res.*, v. 65, p. 3656-3663, 2005.

SOLIS, M.; GOUBAU, D.; MOUREZ, R. R.; GENIN, P.; CIVAS, A.; HISCOTT, J. Distinct functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN- $\alpha$  gene regulation and control of anti-tumor activity in primary macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, v. 72, p. 1469-1476, 2006.

SONG, S. H.; LEE, J. K.; LEE, N. W.; SAW, H. S.; KANG, J. S.; LEE, K. W. Interferon-gamma (IFN-gamma): a possible prognostic marker for clearance of high-risk human papillomavirus (HPV). *Gynecol. Oncol.*, v.108, p. 543–548, 2008.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Ver. Cancer.*, v. 6, p. 813-823, 2006.

TYAGI, P., CHANCELLOR, M.B.; LI, Z.; DE GROAT, W.C. ; YOSHIMURA, N.; FRASER, M.O.; HUANG, L. Urodynamic and immunohistochemical evaluation of intravesical capsaicin delivery using thermosensitive hydrogel and liposomes. *J. Urol.*, v. 171, p. 483–489, 2004.

WAKABAYASHI, N.; SLOCUM, S.L.; SKOKO, J.J. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox Signal.*, v.13, p.1649–1663, 2010.

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

WANG, S.; EL-DEIRY, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, v. 22, p. 8628–8633, 2003.

WEAVER, J.R.; FISHWICK, D. A. T. Regulation of NOX-1 expression in beta cells: A positive feedback loop involving the Src-kinase signaling pathway. *Mol. Cell Endocrinol*, v. 369, p. 35-41, 2013.

WIECZOREK, E.; RESZKA, E.; JABLONOWSKI, Z.; JABLONSKA, E.; KROL, M. B.; GRZEGORCZYK, A.; GROMADZINSKA, J.; SOSNOWSKI, M.; WASOWICZ, W. Genetic polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MPs (TIMPs), and bladder cancer susceptibility. *BJU Int.*, v.112, p. 1207–1214, 2013.

WU, X. R.; MANABE, M.; YU, J.; SUN, T. T. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II and III. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 19170–19179, 1990.

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

YUASA H., OZEKI T, TAKAHASHI H, KANAYA Y, UENO M. Application of the solid dispersion method to the controlled release of medicine. VI. Release mechanism of slightly

water soluble medicine and interaction between flurbiprofen and hydroxypropyl cellulose in solid dispersion. *Chem. Pharm. Bull.*, v.42, p.354-358, 1994.

ZUPANČIČ, D.; ZAKRAJŠEK, M.; ZHOU, G.; ROMIH, R. Expression and localization of four uroplakins in urothelial preneoplastic lesions. *Histochem. Cell Biol.*, v.136, p.491-500, 2011.

ZHOU, L.Z.; JONHSON, A.P.; RANDO, T.A. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p.1405-1416, 2001.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

## 6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer no Brasil. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/Comentarios/Parte466\\_registro\\_de\\_base\\_populacional\\_completo.pdf](http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/Comentarios/Parte466_registro_de_base_populacional_completo.pdf). Acesso em 23 nov. 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SYLVESTER, R. J.; van der MEIJDEN, A. P.; OOSTERLINCK, W.; WITJES, J. A.; BOUFFIOUX, C.; DENIS, L.; NEWLING, D. W.; KURTH, K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur. Urol.*, v. 49, issue 3, p. 466-477, 2006.

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

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

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

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

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

**ANEXO 1 – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA**



CEUA/Unicamp

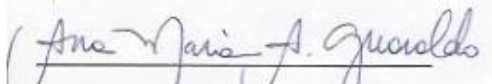
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

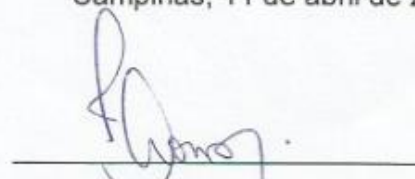
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Efeitos das Imunoterapias Intravesicais com Bacilo Calmette-Guerin e P-MAPA na Progressão do Câncer de Bexiga Urinária de Ratos: Análises do Estresse Oxidativo, Enzimas Antioxidantes e Sinalização Via Receptores Toll-Like 2 e 4" (protocolo nº 2684-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Wagner José Fávaro, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 11 de abril de 2012.

Campinas, 11 de abril de 2012.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

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

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

## **ANEXO 2 - CARACTERIZAÇÃO DO P-MAPA**

## CARACTERIZAÇÃO DO P-MAPA

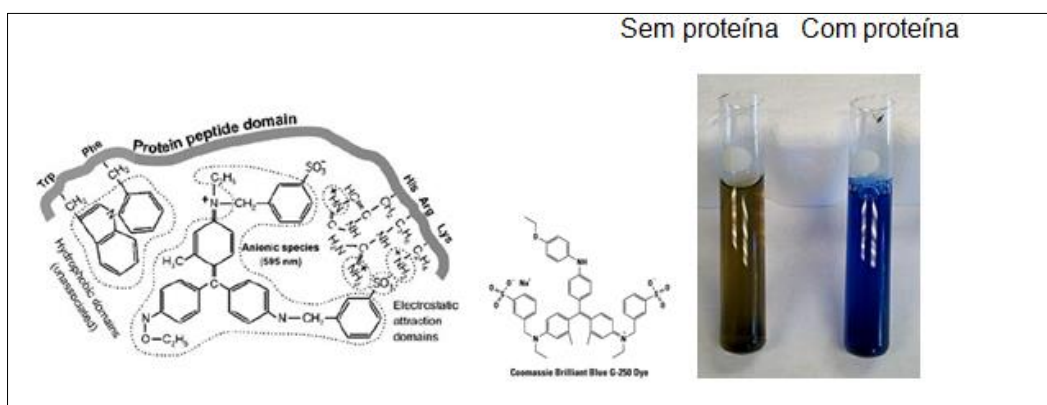
Fonte: Farmabrazilis.

### ANÁLISE DOS COMPONENTES DO P-MAPA PELOS MÉTODOS QUÍMICOS E ESPECTROSCÓPICOS

#### ANÁLISE QUÍMICA DOS CRISTAIS DE P-MAPA

##### PROTEÍNA:

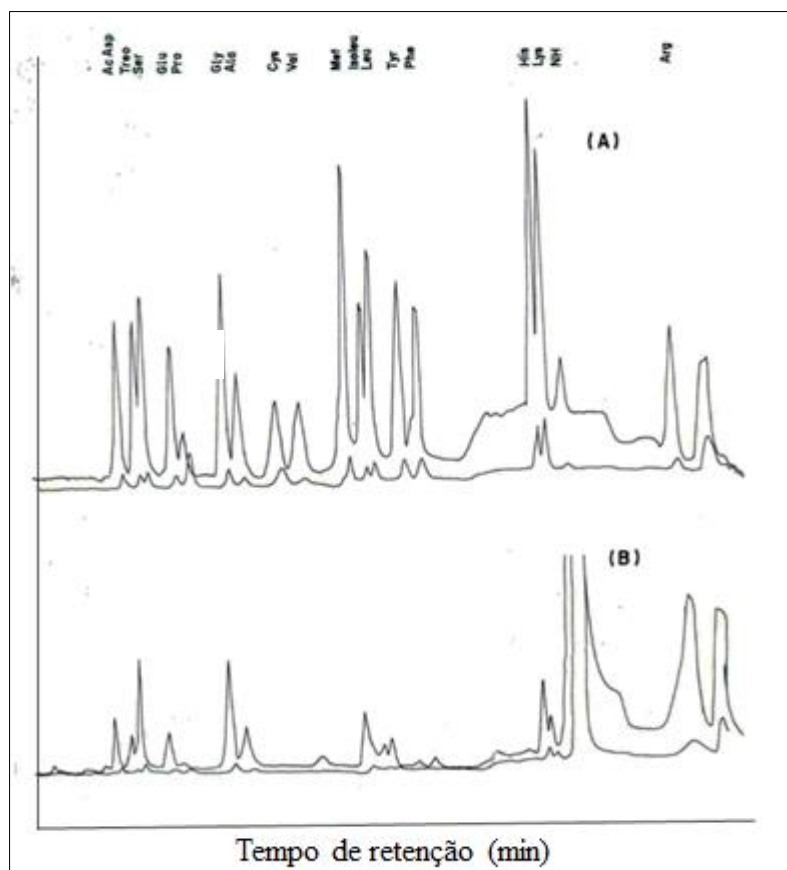
Para a análise do conteúdo de proteína foi utilizado o método de Bradford (Coomassie Brilliant Blue), chegando-se a um conteúdo de  $0.49 \pm 0.07\%$  de para aproximadamente 100 amostras independentes produzidas pelo microrganismo. A albumina foi utilizada como padrão (Figura 1).



**Figura 1.** Método de Bradford.

Os valores calculados em função de padrões de aminoácidos em (A) são mostrados em (B) para a proteína do P-MAPA. A composição dos aminoácidos foi observada através de um Analisador de Aminoácidos Automático (Beckman analyzer model 119C1) com padrões internacionalmente reconhecidos (**Figura 2**)

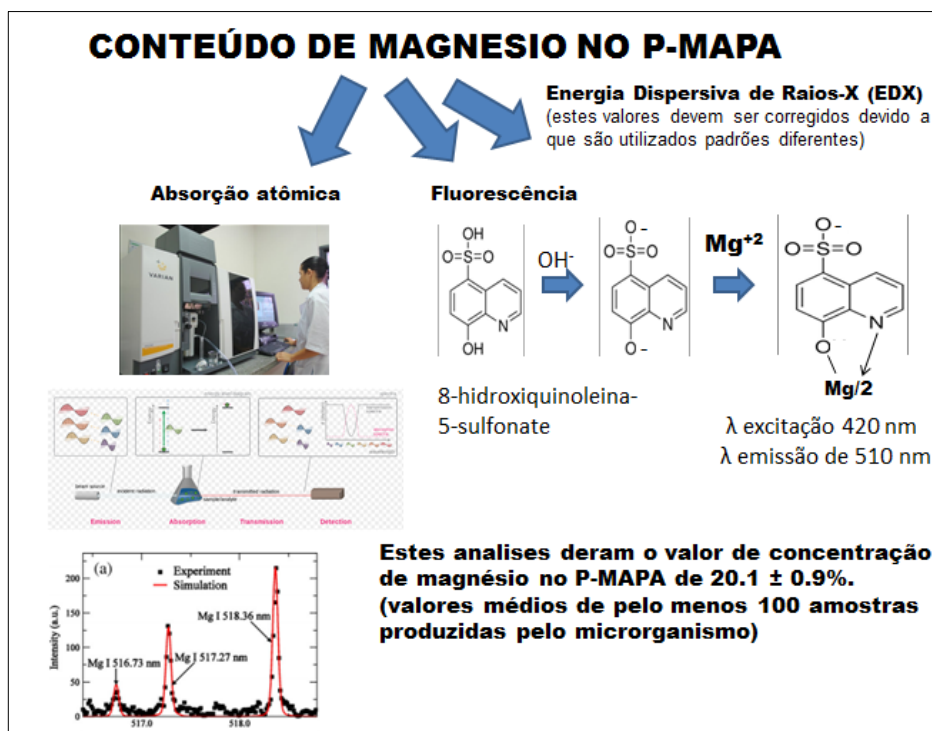
Esta análise mostrou os valores de aminoácidos na forma quantitativa e foram (%): Asp (7.2), Thr (3.6), Ser (7.6), Glu (8.4), Pr (0.5), Gly (9.7), Ala (7.5), Cys (0.1), Val (1.0), Met (4.4), Ile (2.5), Leu (3.0), Tyr (0.5), Phe (1.0), His (2.8), Lys (3.6), Trp (1.3) e Arg (35.2) .



**Figura 2.** Perfis de aminoácidos (A) Padrões e (B) Proteína do P-MAPA.

### CONTEÚDO DE MAGNÉSIO NO P-MAPA

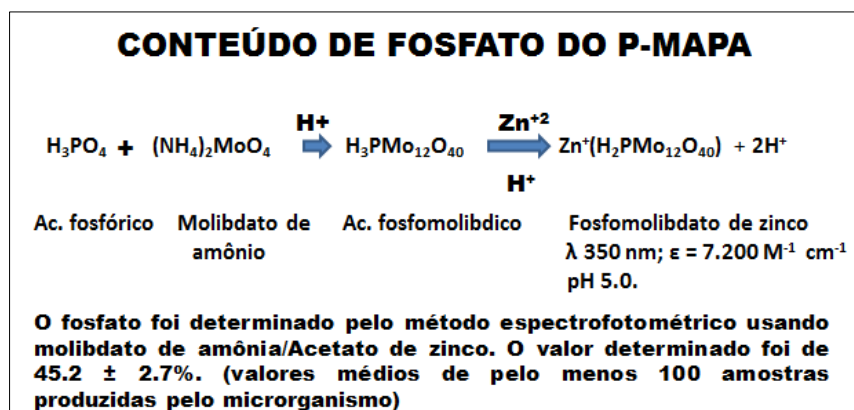
Foram feitas análises por absorção atômica, por fluorescência usando o método de sulfonato de 8-hidroxiquinoleína ( $\lambda$  excitação 420 nm,  $\lambda$  emissão de 510 nm e por energia dispersiva de raios-X (EDX) (**Figura 3**). Nestas análises o valor de concentração de magnésio do P-MAPA de  $20.1 \pm 0.9\%$  (valores médios de aproximadamente 100 amostras produzidas pelo microrganismo).



**Figure 3.** Esquema de análise de magnésio do P-MAPA.

### CONTEÚDO DE FOSFATO DO P-MAPA

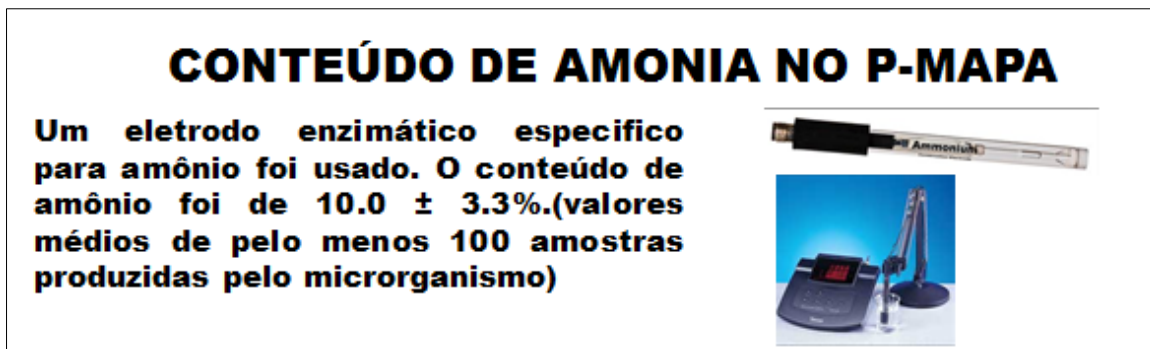
O fosfato foi determinado pelo método espectrofotométrico usando Molibdato de amônia/Acetato de zinco. O valor determinado foi de  $45.2 \pm 2.7\%$ . (valores médios de aproximadamente 100 amostras produzidas pelo microrganismo) (**Figure 4**).



**Figure 4.** Esquema de análise de fosfato em P-MAPA.

### CONTEÚDO DE AMONIA DO P-MAPA

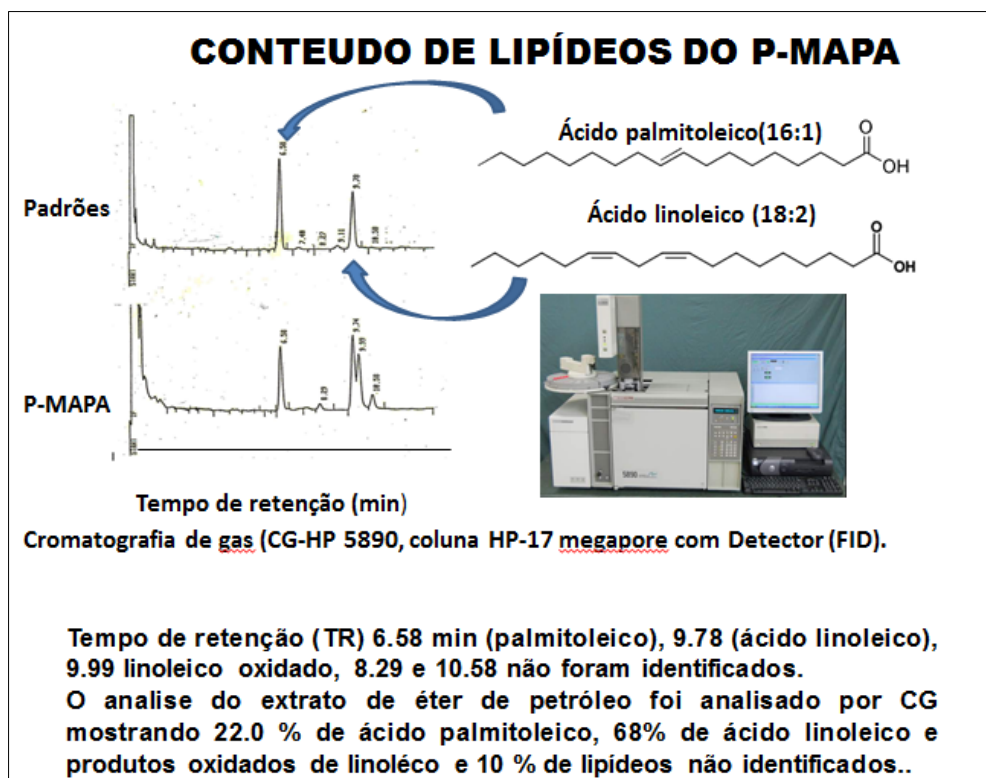
Um eletrodo enzimático específico para amônia foi utilizado (Cole Palmer EW-27502-00). O conteúdo de amônia foi de  $10.0 \pm 3.3\%$  (valores médios de aproximadamente 100 amostras produzidas pelo microrganismo) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Eletrodo enzimático para íons amônia.

### CONTEÚDO DE LIPÍDEOS DO P-MAPA

A análise foi realizada por cromatografia gasosa após extração do P-MAPA em meio ácido com éter de petróleo e mostrou ser 11.6% por peso da amostra. Na parte superior estão os padrões de tempo de retenção (TR) 6.58 min (palmito-oleico) e 9.78 (ácido linoleico) e 9.99 linoleico oxidado (CG 5820, coluna HP-17 megapore com Detector (FID) (**Figura 6**).

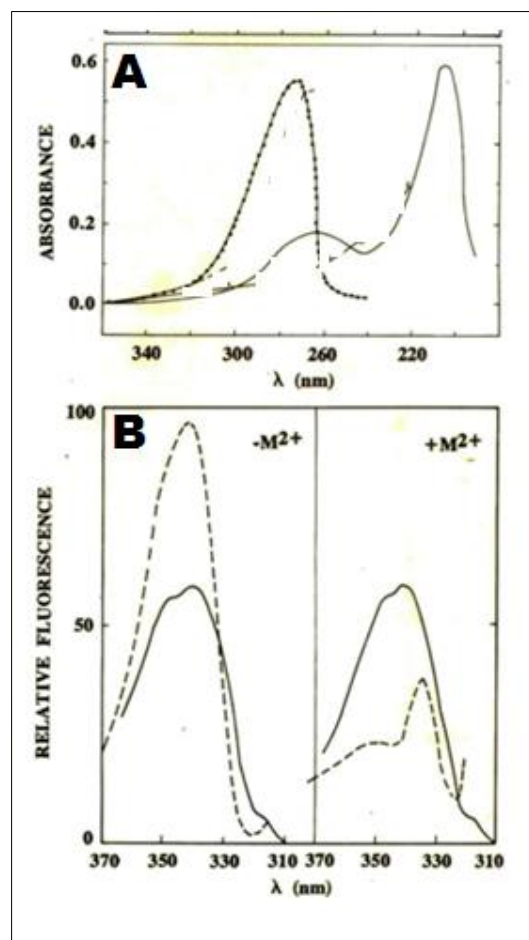


**Figura 6.** Análise cromatográfica de gás por silinização (derivados de silício) dos ácidos graxos.

A análise do extrato de éter de petróleo foi realizada por CG (Fig. 6) mostrando 22.0 % de ácido palmito-oleico, 68% de ácido linoleico e produtos oxidados de linoleico (TR 9.99) e 10 % de lipídeos não identificados.

### ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA E DE FLUORESCÊNCIA DO P-MAPA

O espectro de absorvância do P-MAPA levemente ácido e imediatamente após diluição apresenta duas máximas a 205 nm e a 265 nm e a 275 nm na presença de EDTA (elimina o íon magnésio da solução) (Intralab DMS-100 Spectrometer) (**Figura 7A**).



**Figura 7.** (A) Espectro de absorção do P-MAPA e B) espectro de fluorescência do P-MAPA. O espectro de linha contínua corresponde a solução de albumina em (B).

O espectro de fluorescência ( $\lambda$  exc. 295 nm) apresenta uma banda de emissão a 340 nm (correspondente ao triptofano) na ausência do magnésio (presença de EDTA) (Hitashi-Perkin Elmer MPF-44B spectrofluorometer). Na presença de magnésio praticamente essa emissão desaparece (Fig.7B).

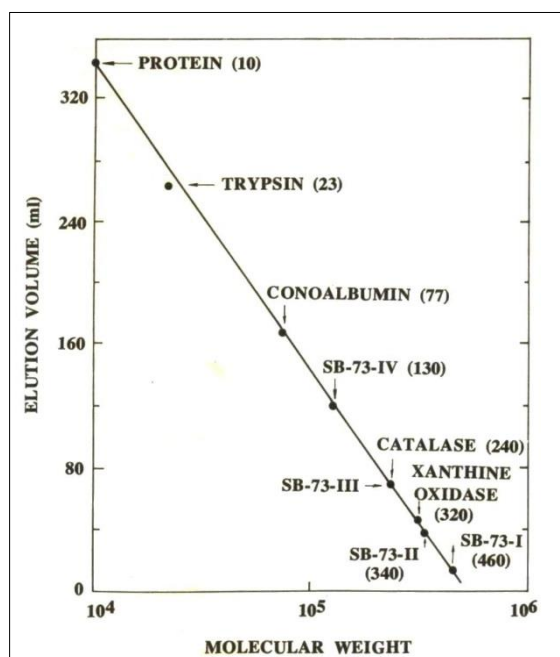
Aparentemente a presença de magnésio no P-MAPA mantém a estabilidade da proteína como mostrado na (Figura 7A e 7B).

Como controle foi analisada a fluorescência da albumina na presença e ausência do magnésio e não surtiu nenhum efeito. Isto mostra que a interação do magnésio com a proteína do P-MAPA é muito particular. No dicróismo circular acontece o mesmo (Não mostrado). O P-MAPA apresenta um valor de  $\theta$  negativo e se desloca na presença de EDTA indicando que passa de uma conformação rígida a uma randômica.

## DETERMINAÇÃO DAS MASSAS MOLARES NOS COMPONENTES DO P-MAPA

A massa molar por filtração em gel em Sephacryl-S-300 foi de aproximadamente 10 KDa para a proteína (proteína (10) (**Figura 8**).

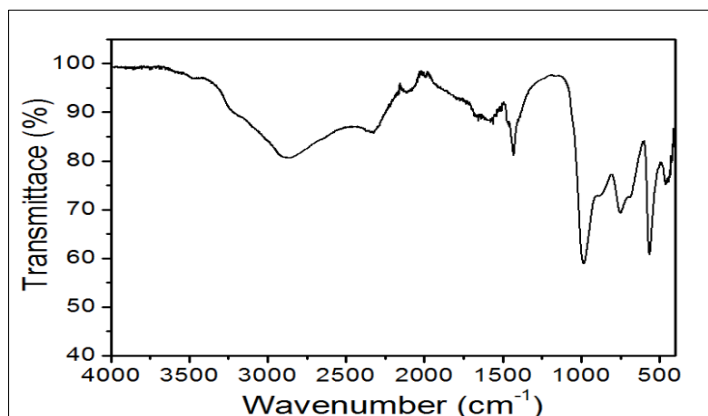
A massa molar do P-MAPA também foi calculada pela mesma figura obtendo um valor médio de 391 KDa.



**Figura 8.** Determinação de massas molares dos componentes do P-MAPA. Os valores indicados com a sigla SB-73 são as frações de P-MAPA em diferentes pHs. As outras moléculas são os padrões utilizados.

## ANÁLISE DOS ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DO P-MAPA

A análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada em forma de pastilhas de KBr (Perkin Elmer 180 spectrophotometer) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

As bandas analisadas foram as seguintes:

3275-3521  $\text{cm}^{-1}$  H-O-H vibração de estiramento de água de cristalização

3006  $\text{cm}^{-1}$  Banda estiramento de CH em  $=\text{C-H}$ .

2928-2952  $\text{cm}^{-1}$  Estiramento assimétrico e simétrico do grupo  $\text{CH}_2$

2398-2483  $\text{cm}^{-1}$  H-O-H vibração de estiramento da água inserida no cluster

1750-1735  $\text{cm}^{-1}$  C=O vibração de estiramento dos grupos carboxílicos em lipídeos.

1655-1705  $\text{cm}^{-1}$  Simetria  $\nu_2$  deformação angular de N-H em unidades de  $\text{NH}_4^+$

1640-1650  $\text{cm}^{-1}$  Amida I

1445-1480  $\text{cm}^{-1}$  Rotação dos  $\text{NH}_4^+$

1574-1550  $\text{cm}^{-1}$  Amida II.

1240  $\text{cm}^{-1}$  P=O estiramento de fosfodiesteres.

1011  $\text{cm}^{-1}$   $\nu_3$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  e/ou  $-\text{O}[\text{PO}_2]-\text{O}-[\text{C}=\text{O}]$ -

618-688  $\text{cm}^{-1}$  Mg-oxigênio ligado

894  $\text{cm}^{-1}$  Estiramento de simetria  $\nu_1$  de unidades  $\text{PO}_4^{3-}$

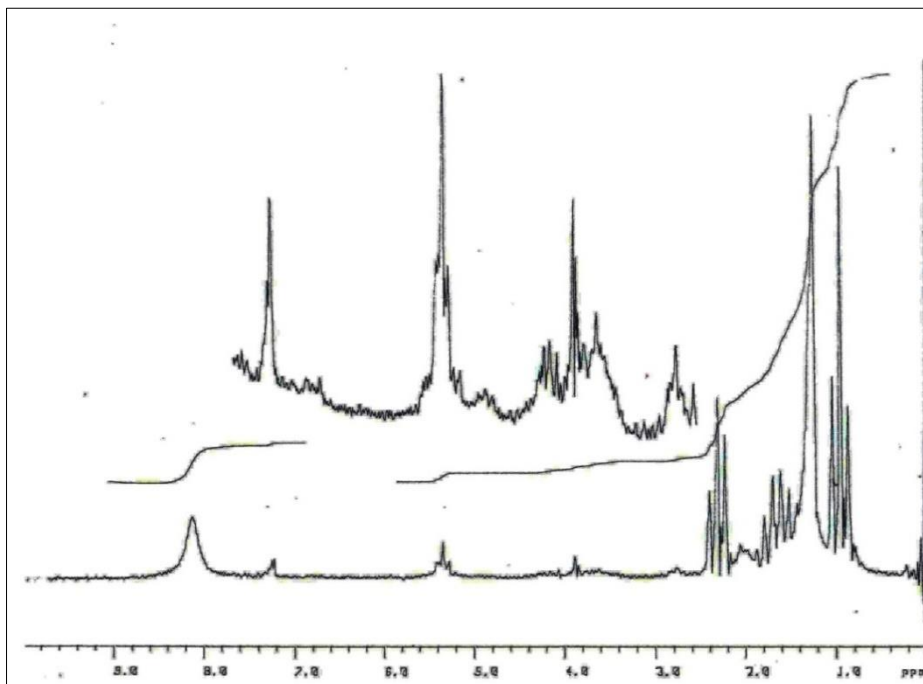
847  $\text{cm}^{-1}$  Deformação do OH ligado ao  $\text{Mg}^{+2}$ .

562-574  $\text{cm}^{-1}$  Assimetria  $\nu_4$  modo de deformação angular de unidades de  $\text{PO}_4^{3-}$

A análise de infravermelho indica uma estrutura de magnésio amônio fosfato associado a lipídeos e proteína.

## ESPECTRO DE RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA DE PROTONS DO P-MAPA

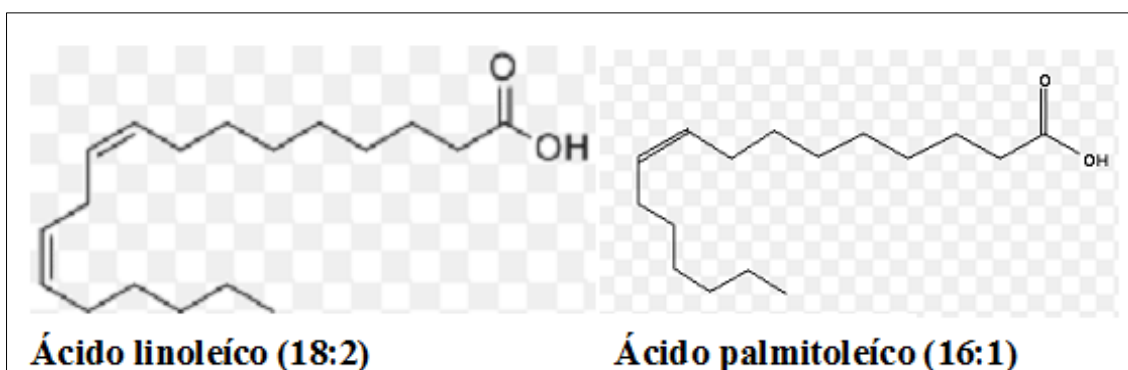
O espectro H-NMR (NMR Bruker 400 Mhz) (Fig.10) da dissolução de P-MAPA em meio ácido é mostrado a seguir;



**Figura 10.** Espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (H-NMR) do P-MAPA.

As bandas do ácido linoleico e do palmito-oleico (**Figura 11**) aparecem aos seguintes valores de  $\delta$  (ppm): 5.35 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 3.78 ( $-\text{O}[\text{C}=\text{O}]-\text{CH}-\text{NH}_2$ ), 2.75 ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 2.00 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1.40 ( $-(\text{CH}_2)_n-$ ), 0.85 ( $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ ).

Valores a 8.27 (NH) e 7.52 ( $-\text{NH}_3^+$ ) mostram a presença de terminais amino de proteínas.

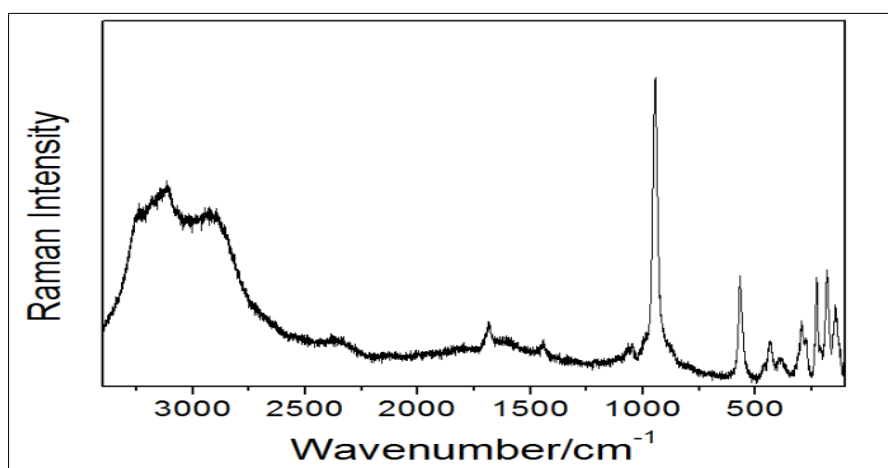


**Figura 11.** Estruturas dos ácidos graxos do P-MAPA.

Novamente é indicativo a presença de lipídeos e proteínas no P-MAPA.

### ESPECTRO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia de Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar informação química e estrutural dos materiais. Sua análise se baseia na luz, monocromática e de determinada frequência espalhada ao incidir sobre o material a ser estudado, cuja maior parte da luz espalhada também apresenta a mesma frequência daquela incidente. Somente uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente frente às rápidas mudanças de frequência, devido à interação da luz com a matéria, e é uma característica intrínseca do material analisado e independe da frequência da luz incidente.



**Figura 12.** Espectro Raman do P-MAPA.

O espectro de Raman (**Figura 12**) (Raman Scattering Spectrometer (Witec)) do P-MAPA mostra o seguinte:

Na aproximação do grupo molecular, todos os modos da água internas são ativos tanto no infravermelho como no Raman. Todos os quatro modos normais são Raman ativos. Como se sabe, os quatro modos de íons fosfato são normais, do ponto de vista de simetria, de forma análoga aos dos íons de amônia.

Na figura do espectro de Raman do P-MAPA é largo, assimétrico e algumas bandas assimétricas e bandas pouco estruturada e se apresentam entre 3400 -2200  $\text{cm}^{-1}$ . A intensidade e a forma desta banda é, obviamente, um resultado de, pelo menos, dois importantes fatores. Por um lado, a largura, a intensidade e a frequência do centro dessas bandas estão em linha com

a força das ligações de hidrogênio na estrutura (especialmente os que são formados pelas moléculas de água).

Como as vibrações são provavelmente não harmônicas, transições de segunda ordem são susceptíveis de estar presentes na mesma região, que interage com modos de estiramento da água fundamental e com íon amônia.

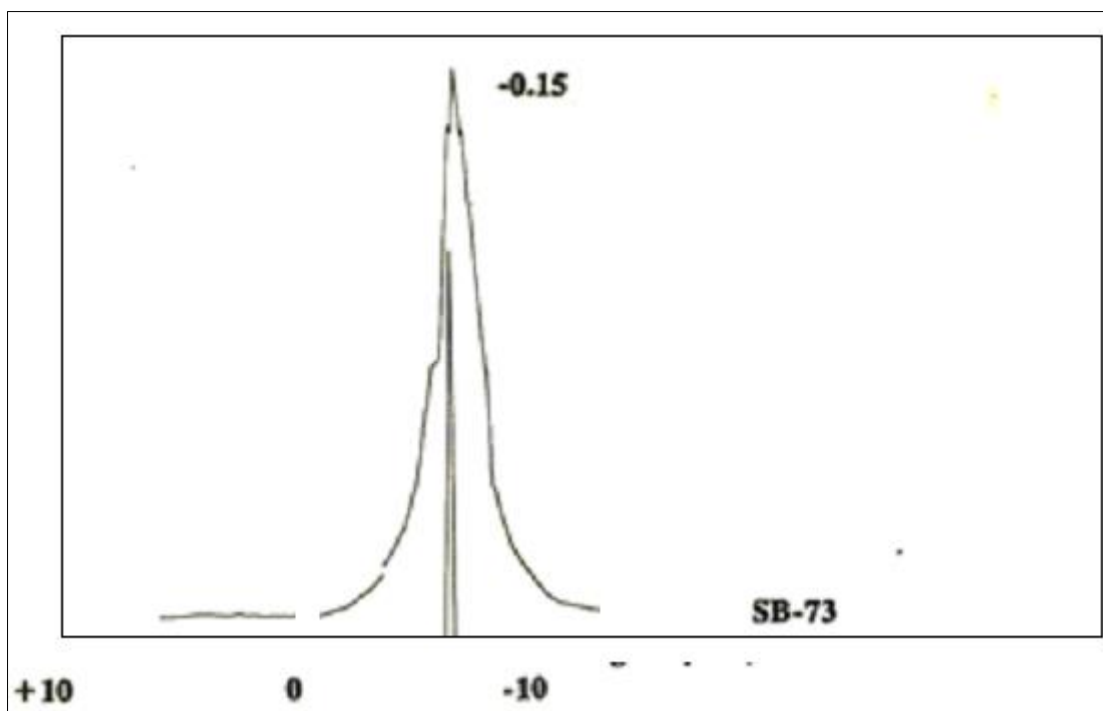
No espectro de Raman do P-MAPA são observados duas bandas a 1702 e 1685  $\text{cm}^{-1}$  e outro par em 1477 e 1442  $\text{cm}^{-1}$ . Assim, os dois primeiros são atribuídos ao modo  $\nu_2$  (duplamente degeneram para a simetria  $T_d$ ) e os dois últimos ao modo  $\nu_4$  (degenerada triplamente para simetria  $T_d$ ) dos íons de amônia. A principal contribuição para o aspecto complexo ao redor de 1600  $\text{cm}^{-1}$ , certamente, vem das vibrações do  $\delta(\text{HOH})$  ou, talvez, de modos que têm um caráter considerável de  $\delta(\text{HOH})$ .

A situação com as vibrações dos íons fosfato do P-MAPA exibiu uma banda no espectro de Raman, que é originária dos componentes da vibração de estiramento simétrico  $\nu_1$  (sua frequência é 943  $\text{cm}^{-1}$ ). Tal imagem espectral (banda de Raman muito forte e uma de infravermelho excepcionalmente fraca) é consistente com os valores muito pequenos dos índices de deformação de Baur, por exemplo com uma alta simetria efetiva, perto da  $T_d$ . Nos espectros de Raman, bandas na região entre 470 e 430  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas a  $\nu_2$  ( $\text{PO}_4$ ) e/ou ao modo  $\nu$  ( $\text{Mg-O}$ ).

Nas bandas ativas de Raman as amidas I, II e III aparecem a 1650, 1550 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Bandas bem definidas aparecem entre 400-430  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a  $\text{C=O}$  de amidas e possivelmente associados a lipídeos (lipoproteína).

## ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE FÓSFORO-31 DO P-MAPA

O espectro  $^{31}\text{P}$ -NMR (**Figura 13**) (Bruker 400 Mhz) indica a não linearidade do poli-fosfato já que deveria estar ao redor de -22 ppm. Comparando o espectro de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ . Que é deslocado a -2.4 ppm em  $\text{NH}_4\text{HPO}_3\text{-O-[C=O]-CH}_3$ , que comparado com P-MAPA sugere que o mesmo tipo deve estar presente no P-MAPA, a banda larga centrada a -0.15 ppm do P-MAPA é consistente com a presença de grupos  $\text{O-[PO}_2\text{]-Mg-}$  e  $\text{-O-[PO}_2\text{]-O-[C=O]-CH}_2\text{-}$ .



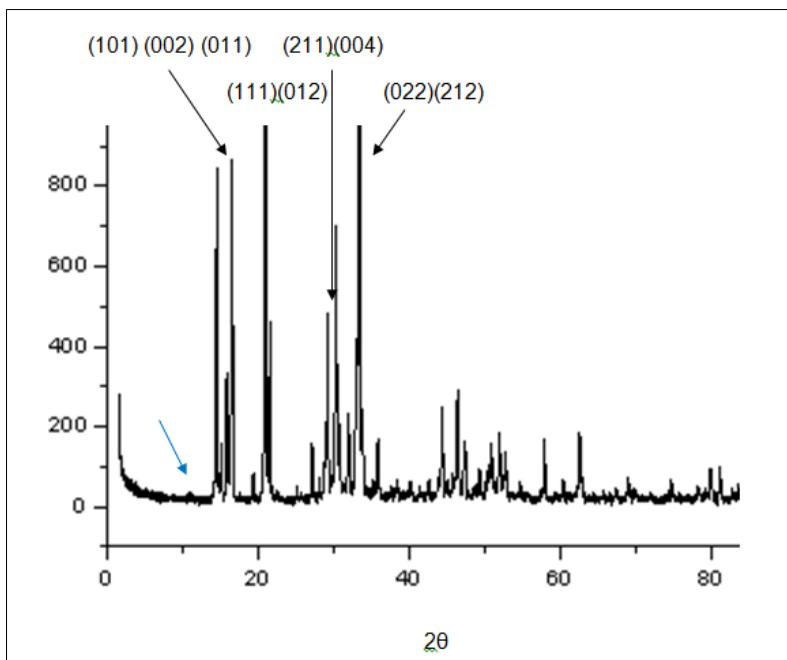
**Figura 13.** Espectro de ressonância nuclear magnética de fosforo 31 ( $^{31}\text{P}$ -NMR).

Logo, o espectro  $^{31}\text{P}$ -NMR mostra claramente que o magnésio está associado ao fosfato e não a poli fosfatos.

#### **ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) DO P-MAPA.**

A difração de raios X (DRX) (X-Diffractometer Shimadzu XRD7000) é uma técnica padrão para caracterizar a estrutura cristalina dos materiais. Ela também pode ser utilizada para quantificar o tamanho dos cristais ( $L_c$ ) em materiais.

No caso do P-MAPA o DRX (**Figura 14**) apresenta vários valores de difração como analisadas na figura abaixo.



**Figura 14.** Difratoograma do P-MAPA.

O P-MAPA apresenta de picos de difração ( $2\theta$ ) a 15.77, 20.84, 21.43, 27.06, 30.62, 31.88, 33.27, e 33.67 que podem ser correlacionados com índices (hkl) (002), (111), (012), (103), (211), (004), (022), e (212) respectivamente dos cristais de hexagonais de amônio magnésio fosfato na literatura (JCPDS card). As diferenças em algumas reflexões são provavelmente de orientações preferidas na presença de produtos orgânicos (lipídeos e proteínas).

O DRX do P-MAPA purificado da cultura até monocristal mantém perfeitamente a estrutura original na figura de SEM anterior (**Figura 14**). Mas vários picos não correspondem a parte inorgânica de amônio magnésio fosfato cristalino.

A amostra analisada como monocristal após exaustiva recristalização mostra características similares do P-MAPA e seu tamanho micro (**Figura 15**).

**Figura 15.**

Difração de raios-X do monocristal de P-MAPA. O monocristal foi fotografado num microscópio óptico de alta resolução.

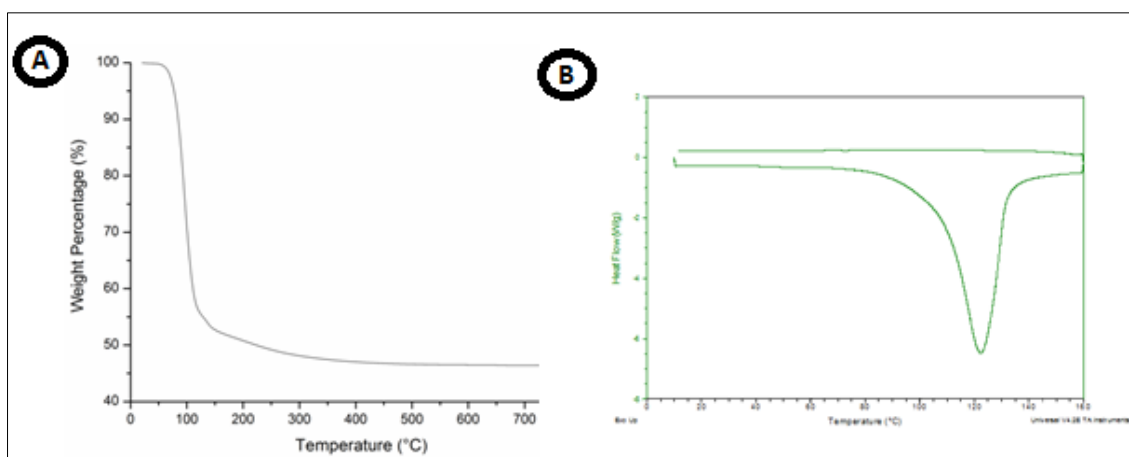
Embora altamente recristalizado e eliminado a maioria dos produtos orgânicos do P-MAPA ainda ficaram elementos não caracterizados na estrutura inorgânica de amônio magnésio fosfato cristalino. Possivelmente são partes lipídicas e protéica de alguma maneira associada ao cristal de amônio magnésio fosfato.

#### **ANÁLISE POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) e ANALISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DO P-MAPA.**

A análise termogravimétrica (Thermogravimetric Analyzer TA-STO-Q-600) é uma técnica destrutiva no ramo das análises térmicas, na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC Q-10-TA-Instrument) é uma técnica de análise térmica que registra o fluxo de energia calorífica associada a transições nos materiais

em função da temperatura. É um método de variação de entalpia, no qual a diferença é medida em função da temperatura, enquanto ambas são submetidas a um mesmo programa de aquecimento ou resfriamento rigorosamente controlado.



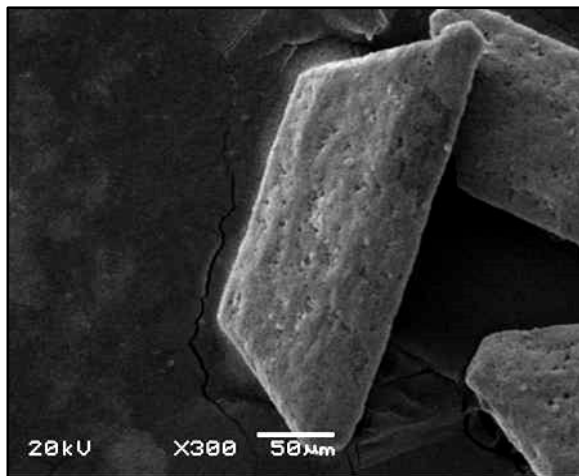
**Figura 16.** Gráfico de análise termogravimétrica (TGA) (A) e gráfico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) do P-MAPA (B).

O gráfico de TGA (**Figura 16**) mostra a perda de pesos ao início de 50°C. Provavelmente a perda de peso de proteínas é em torno de 20% antes dos 50°C, seguido de uma perda acentuada nas temperaturas entre 65-200°C, e posteriormente um aumento na temperatura causa apenas uma perda de peso progressiva. A perda em peso (em torno de 45%) aos 125°C, que pode ser atribuída à liberação das moléculas de água cristalina do P-MAPA. A segunda perda de peso de cerca de 8% em peso (ou 53% total), entre 125 e 235°C, pode ser devido a liberação de amônia. Perda de peso contínuo durante TGA, indica que a desidratação/decomposição da amostra e liberação de amônia e moléculas de H<sub>2</sub>O acontece simultaneamente e como também degradação dos lipídeos.

O gráfico de DSC mostra que ao redor 50°C um processo endotérmico próprio de desnaturação de proteínas e de ácidos graxos poderia estar ocorrendo. Também apresenta um pico centrado ao redor de 122°C. Este pico pode ser atribuído a uma perda principal durante o aquecimento. A existência de somente um pico no DSC sugere que a perda de amônia e água no P-MAPA ocorre simultaneamente.

### MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO P-MAPA

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) (**Figura 17**) (TEC Autoscan model U1) mostra uma estrutura com um grau de cristalinidade muito elevada. Apresenta uma morfologia ortorrômbica.

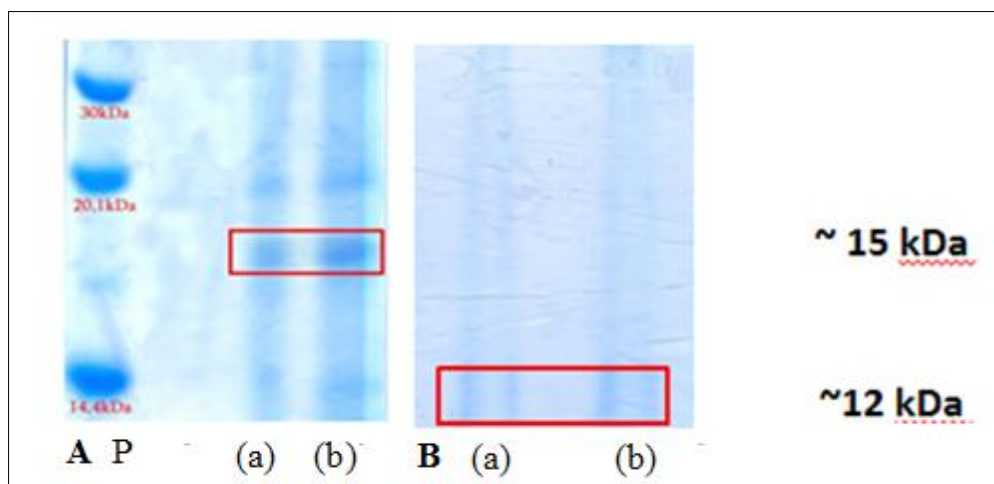


**Figura 17.** Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) do P-MAPA.

### TENTATIVAS DE DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA DO P-MAPA

A dissolução do P-MAPA cristalino em HCl seguido de diluição em igual volume com água destilada permite uma hidrólise do P-MAPA. Para a concentração da proteína, a amostra é dialisada e logo liofilizada (50 horas). Ao final a proteína seca foi armazenada em congelador para as análises a seguir.

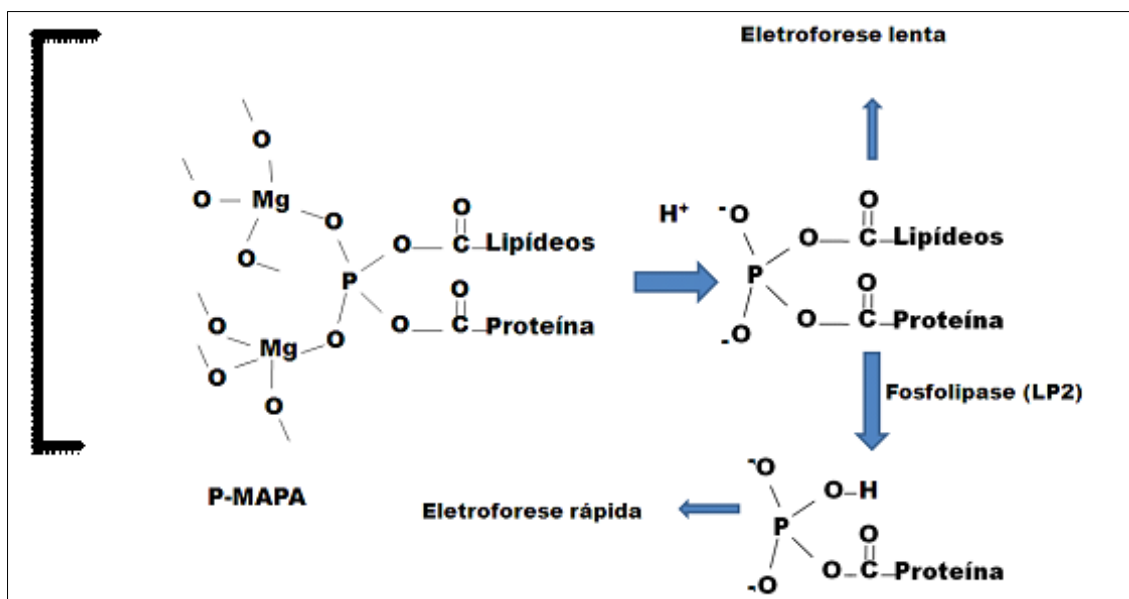
Utilizou-se a técnica de SDS-PAGE para expressar a proteína do P-MAPA. Assim, através deste gel, pode ser confirmado o que havia sido relatado anteriormente, que a proteína do P-MAPA tem peso molecular entre ~10 kDa (**Figura 18**).



**Figura 18.** Gel bidimensional da proteína do P-MAPA em SDS-PAGE (7,5%). 12 horas de corrida A: (a) e (b) diferentes concentrações da proteína do P-MAPA. B: (a) e (b) diferentes concentrações de proteína P-MAPA tratados com fosfolipase (PLA2).

Nos ensaios e análises do tamanho da proteína alvo, foi observado que durante as corridas de eletroforese, a proteína aparece com uma mobilidade iônica baixa que não está relacionada com o seu tamanho. Aparentemente, o agente detergente iônico, SDS, não interage fortemente com a proteína do P-MAPA, conferindo-a uma baixa carga. As argininas que são a maioria dos resíduos da proteína do P-MAPA apresentam as cadeias laterais com a carga positiva no pH do meio usado na eletroforese enquanto que o detergente SDS confere a carga negativa a proteína desnovelada. Desta forma, o possível motivo de uma separação lenta na eletroforese deve-se ao fato da proteína alvo possuir uma baixa carga negativa.

Uma possível hipótese para uma corrida de eletroforese lenta, seria que a proteína do P-MAPA poderia estar ligada covalentemente ao grupo fosfato apresentando a estrutura de uma lipoproteína, como mostrado no quadro abaixo (**Figura 19**). No lugar do grupo polar (fosfato), podemos encontrar a proteína ligada. Em ensaios de hidrólise da proteína alvo com uso de uma fosfolipase do tipo A2 (PLA2) de serpente percebeu-se que sua mobilidade foi maior e possivelmente deva-se aos grupos lipídicos que foram eliminados da estrutura lipoproteica, talvez formando um acilfosfato como mostrado na figura 19.



**Figura 19.** Esquema de ligação entre os lipídeos e a proteína no P-MAPA.

Esta estrutura tem dificultado a análise da seqüência da proteína. Com este conhecimento se tem condições de chegar a análise da estrutura primária da proteína do P-MAPA.

## **COMPONENTES DO P-MAPA (%) APÓS TODAS AS ANÁLISES REALIZADAS**

Fosfatos: 45.2

Magnésio: 20.1

Amônio: 10.0

Lipídeos: 20.1

-Ácido linoléico: 42.9% (18:2)

-Ácido linoléico oxidado: 24.9% (provavelmente no processo de extração).

-Ácido palmito-oleico: 22.7% (16:1)

-Ácidos graxos não identificados: 10.0%

Proteína: 0.5

Aminoácidos (%): Asp (7.19), Thr (3.56), Ser (7.56), Glu (8.35), Pr (0.5), Gly (9.69), Ala (7.46), Cys (0.1), 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)

## **RESUMO DAS ANÁLISES DE P-MAPA**

### **ANÁLISE ELEMENTAR DO P-MAPA RECRISTALIZADO SEM PRODUTOS ORGÂNICOS**

Hidrogênio: 4.93%

Nitrogênio: 5.71%

Oxigênio: 65,2% (calculado por diferença)

Carbono: 0.0%

### **ANÁLISE ELEMENTAR DO P-MAPA COM PRODUTOS ORGÂNICOS DE AMOSTRA ÚMIDA (amostra P-17)**

Hidrogênio: 6.20%

Nitrogênio: 4.76%

Oxigênio: 57.6% (calculado por diferença)

Carbono: 0.45%

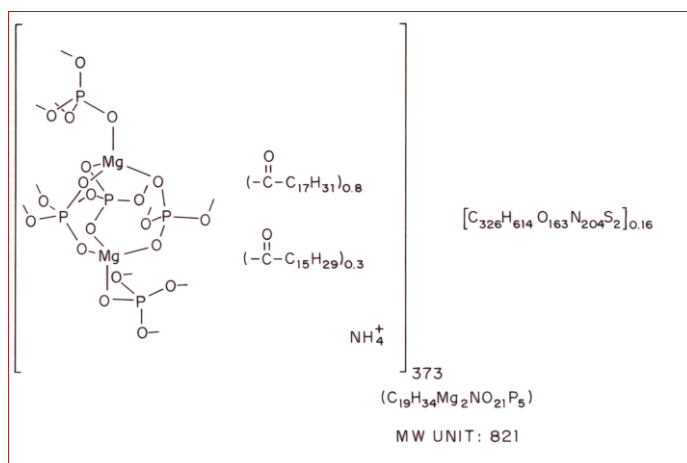
### **ANÁLISE PELO EDX APÓS CORREÇÃO PARA UMIDADE E PADRÕES UTILIZADOS NA ANALISE POR EDX (amostra P-17)**

Os valores apresentados de EDX (Mg: 10.77%; P: 14.99%) foram corrigidos para equivalência a análises químicas e umidade:

Mg: 20%

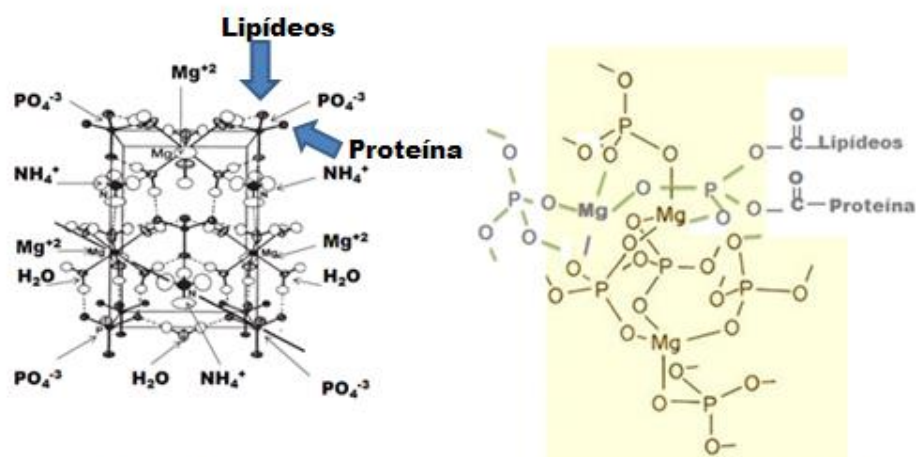
P: 45%

Os dados químicos anteriores permitiram propor a estrutura hipotética abaixo pela análise exaustiva de componentes por diferentes metodologias apresentadas, dando uma forma simplificada e está indicada na **Figura 20**.



**Figura 20.** Estrutura hipotética do P-MAPA.

Mas, atualmente com os estudos estruturais de monocristais por raios-x e de estudos com os elementos orgânicos presentes na estrutura cristalina levaram a seguinte proposta:



Estes dados permitem propor a estrutura em função dos aspectos teóricos e seu análise exaustivo de componentes pela diferentes metodologias apresentadas. Por unidade cristalina temos:  $7 \text{ PO}_4^{3-} / 3 \text{ Mg}^{+2} / 3 \text{ NH}_4^+$

Esta estrutura do P-MAPA está na forma química e simplificada

Finalmente, é interessante mencionar resumidamente as atividades biológicas do P-MAPA:

### ESTUDOS BIOLÓGICOS DO P-MAPA



AGREGADO PROTEICO-FOSFOLINOLEATO-PALMITOLEICO DE AMONIO E MAGNESIO

#### INTERAÇÃO CELULAR IN VITRO



NÃO TÓXICO PARA: 53 células tumorais (NCI-EORTC-NDDO) Linfócitos, fibroblastos (V79).

#### ENSAIOS PRE-CLÍNICOS IN VIVO



#### ENSAIOS CLÍNICOS Fase I/II



(HIV POSITIVOS)

#### PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Efeito antiviral *in vivo*

Herpes virus (HSV e HPV), papiloma virus humano, Punta toro virus (PTV), parvovirus, cinovirus

#### EFEITOS IMUNOPROTETORES E TERAPÊUTICO

*Listeria monocytogenes*, *Plasmodium sp.*, *M. tuberculosis*, *Leishmania sp.*

#### PROPRIEDADES ANTITUMORAIS: REGRESSÃO TUMORAL E AUMENTO DA SOBREVIVÊNCIA

Modelos animais: Carcinoma de Walker 256, carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), carcinoma renal, carcinoma mamário Plasmacitoma, linfossarcoma-180, carcinoma ascítico de Ehrlich (EAT), câncer de bexiga.

Efeitos antimetastáticos: Carcinoma renal (RENCA).

#### PROPRIEDADES IMUNOMODULADORIAS

Estimula a produção de citocinas (interferon-gama e interleucina 2), amplifica a atividade das células NK e estimula a liberação de NO por macrófagos.

Modula a hemopoiese, atuando no aumento e expressão de unidades formadoras de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea. Estimula receptores celulares (Toll-like receptors-TLR).

**TOXICIDADE:** Estudos com animais (camundongos, ratos, Cães, macaco) mostraram não toxicidade.

**farmabrilis**