



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**CÂNCER DE BEXIGA: DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO E
AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* Mart. E
Geissospermum vellosii IN VITRO CONTRA CÉLULAS T24**

Pedro Ivo de Sousa Neto

**São Luís
2024**

PEDRO IVO DE SOUSA NETO

**CÂNCER DE BEXIGA: DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO E
AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* Mart. E
Geissospermum vellosii IN VITRO CONTRA CÉLULAS T24**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos Biológicos em Saúde

Linha de Pesquisa: Pesquisas em Oncologia e áreas correlatas

Orientador: Dr. Marcelo Souza de Andrade

Co-orientador: Dr^a. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

São Luís
2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

de Sousa Neto, Pedro Ivo.

CÂNCER DE BEXIGA: DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO E AÇÃO DOS
EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* Mart. E *Geissospermum*
vellosii IN VITRO CONTRA CÉLULAS T24 / Pedro Ivo de Sousa
Neto. - 2024.

81 f.

Coorientador(a) 1: Maria do Desterro Soares Brandão
Nascimento.

Orientador(a): Marcelo Souza de Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. MicroRNAs. 2. Neoplasias de Bexiga Urinária. 3.
Produtos Naturais. I. Soares Brandão Nascimento, Maria do
Desterro. II. Souza de Andrade, Marcelo. III. Título.

PEDRO IVO DE SOUSA NETO

**CÂNCER DE BEXIGA: DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO E
AÇÃO DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* Mart. E
Geissospermum vellosii IN VITRO CONTRA CÉLULAS T24**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____ / ____ / ____.

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Lilalea Gonçalves França (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartagenes (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Josélia Alencar Lima (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e perseverança para superar os desafios e completar esta jornada.

Aos meus queridos pais, Clênia e Manoel, expresso minha profunda gratidão por seu amor incondicional, apoio emocional e incentivo constante. Sem a base sólida que me proporcionaram, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Ana e Paulo, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando momentos de tensão e alegria, o meu carinho e reconhecimento por sua paciência e compreensão.

À UFMA e ao PPGSAD, representados por todos os colaboradores que se dedicam diariamente em suas dependências, minha gratidão pela oportunidade de crescimento acadêmico e profissional, assim como pelos recursos disponibilizados que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu orientador, Marcelo, minha coorientadora, Maria do Desterro, e à professora Jaqueline Pinho, minha sincera gratidão por sua sabedoria, paciência e dedicação. Seu olhar crítico e apoio constante foram essenciais para o meu desenvolvimento científico e pessoal. Agradeço por suas valiosas contribuições, orientações precisas e por acreditarem no potencial deste trabalho.

Um agradecimento especial à professora Josélia e ao Vicktor que despenderam seu tempo e conhecimento para auxiliar na construção das bases desta pesquisa, bem como nos experimentos, tornando possível a sua concretização.

Ao LCC, ao LIAC, ao LABMOL, ao LQPN, ao Instituto de Química da USP e a todos que compõem suas equipes, em especial à Monique, Lila e Rafael, pela disposição em ajudar, pela disponibilidade, pelo compartilhamento de ideias e pela amizade que se formou durante esses anos.

À CAPES e à FAPEMA, cujo suporte financeiro foi indispensável para a realização deste trabalho. Os recursos por elas disponibilizados não apenas viabilizaram a execução dos experimentos, mas também contribuíram significativamente para a minha formação como pesquisador.

Aos meus amigos, agradeço por estarem sempre presentes, oferecendo palavras de incentivo essenciais para manter o equilíbrio durante esta caminhada.

A todos, meu sincero obrigado.

RESUMO

Introdução: O câncer de bexiga representa um desafio significativo para a saúde pública global. O diagnóstico oportuno pode ser limitado pela dependência de métodos diagnósticos invasivos ou de baixa sensibilidade, enquanto o tratamento frequentemente envolve abordagens agressivas, alta morbidade e efeitos colaterais. Nesse contexto, os produtos naturais surgem como potenciais vias terapêuticas alternativas. *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* são espécies brasileiras, encontradas na Amazônia maranhense, que vêm despertando interesse científico na pesquisa de tratamentos antineoplásicos. A literatura apresenta uma lacuna significativa no que diz respeito à investigação dos potenciais efeitos anticancerígenos desses extratos na terapia contra o câncer de bexiga. **Objetivos:** Analisar o potencial citotóxico dos extratos da semente de *Euterpe oleracea* Mart. e da casca do caule de *Geissospermum vellosii* em linhagem celular T24, bem como buscar na literatura microRNAs como biomarcadores diagnósticos não invasivos no câncer de bexiga. **Metodologia:** Células T24 foram cultivadas em meio McCoy's, semeadas em placas de 96 poços e tratadas com extrato de *G. vellosii* (5–100 µg/mL) e extrato de *E. oleracea* (50–1000 µg/mL) por 24, 48 e 72 horas. A citotoxicidade foi avaliada com teste do MTT. Na migração celular, células foram semeadas em placas de 96 poços e, após confluência, realizada ranhura em cada poço, seguida de registros fotográficos. Novos registros foram realizados 24 horas após tratamento com extrato de *G. vellosii*. Foi realizada ainda revisão sistemática para apresentar as principais evidências atuais sobre a utilização de miRNAs como biomarcadores no diagnóstico não invasivo do câncer de bexiga. **Resultados:** Extratos de *E. oleracea* ($IC_{50} = 171,1$ e $133 \mu\text{g/mL}$) e de *G. vellosii* ($IC_{50} = 24,36 \mu\text{g/mL}$) inibiram a viabilidade celular em linhagem T24 de modo tempo e concentração-dependente. Houve redução da capacidade migratória de T24 de modo concentração-dependente após 24 horas de tratamento com o extrato de *G. vellosii*, sendo mais eficaz que a cisplatina ($5 \mu\text{M}$), com fechamento da ranhura de 100% para controle e cisplatina, e de $81,8 \pm 0,3\%$ ($20 \mu\text{g/mL}$), $62,2 \pm 9,4\%$ ($40 \mu\text{g/mL}$) e $23,8 \pm 6,5\%$ ($60 \mu\text{g/mL}$) para o extrato. Realizou-se revisão sistemática em julho de 2022 na base de dados Medline, de acordo com as diretrizes PRISMA. A busca inicial recuperou um total de 437 estudos; destes, 21 foram incluídos nas análises finais. Todos os artigos incluídos atenderam

satisfatoriamente aos requisitos de avaliação de risco de viés usando as ferramentas de avaliação crítica do *Joanna Briggs Institute*. Os dados foram coletados com base no miRNA expresso, tipo de amostra, perfil de expressão e precisão. **Conclusão:** *G. vellosoi* e *E. oleracea* foram capazes de reduzir a viabilidade celular e, *G. vellosoi*, a capacidade migratória de T24, demonstrando potencial antitumoral em câncer de bexiga humana. A revisão sistemática demonstrou haver uma tendência de agrupar os miRNA expressos para construir painéis diagnósticos ou utilizá-los em associação com outros métodos diagnósticos, com razoável precisão.

Palavras-chave: Produtos Naturais. Neoplasias de Bexiga Urinária. MicroRNAs.

ABSTRACT

Introduction: Bladder cancer represents a significant challenge to global public health. Timely diagnosis can be limited by dependence on invasive or low-sensitivity diagnostic methods, while treatment often involves aggressive approaches, high morbidity and side effects. In this context, natural products emerge as potential alternative therapeutic routes. *Euterpe oleracea* and *Geissospermum vellosii* are Brazilian species, found in the Maranhão Amazon, which have been arousing scientific interest in research into antineoplastic treatments. The literature presents a significant gap regarding the investigation of the potential anticancer effects of these extracts in bladder cancer therapy. **Objectives:** To analyze the cytotoxic potential of *Euterpe oleracea* Mart. seed extracts. and stem bark of *Geissospermum vellosii* in T24 cell line, as well as searching the literature for microRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers in bladder cancer. **Methodology:** T24 cells were cultured in McCoy's medium, seeded in 96-well plates and treated with *G. vellosii* extract (5–100 µg/mL) and *E. oleracea* extract (50–1000 µg/mL) for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity was assessed using the MTT test. For cell migration, cells were seeded in 96-well plates and, after confluence, a groove was made in each well, followed by photographic records. New recordings were made 24 hours after treatment with *G. vellosii* extract. A systematic review was also carried out to present the main current evidence on the use of miRNAs as biomarkers in the non-invasive diagnosis of bladder cancer. **Results:** Extracts of *E. oleracea* (IC₅₀ = 171.1 and 133 µg/mL) and *G. vellosii* (IC₅₀ = 24.36 µg/mL) inhibited cell viability in strain T24 in a time- and concentration-dependent manner. There was a concentration-dependent reduction in the migratory capacity of T24 after 24 hours of treatment with *G. vellosii* extract, being more effective than cisplatin (5 µM), with 100% groove closure for control and cisplatin, and 81.8 ± 0.3% (20 µg/mL), 62.2 ± 9.4% (40 µg/mL) and 23.8 ± 6.5% (60 µg/mL) for the extract. A systematic review was carried out in July 2022 in the Medline database, in accordance with the PRISMA guidelines. The initial search retrieved a total of 437 studies; of these, 21 were included in the final analyses. All included articles satisfactorily met risk of bias assessment requirements using the *Joanna Briggs Institute* critical appraisal tools. Data was collected based on expressed miRNA, sample type, expression profile, and accuracy. **Conclusion:** *G. vellosii* and *E. oleracea*

were able to reduce cell viability and, *G. vellosoi*, the migratory capacity of T24, demonstrating antitumor potential in human bladder cancer. The systematic review demonstrated that there is a tendency to group expressed miRNAs to construct diagnostic panels or use them in association with other diagnostic methods, with reasonable precision.

Keywords: Natural products. Urinary Bladder Neoplasms. MicroRNAs.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Fechamento de ranhuras após 24 horas de tratamento com extrato de casca de caule de <i>Geissospermum vellosii</i>	Pág. 37
-----------------	---	----------------

CAPÍTULO 2

Table 1	Characteristics of studies involving microRNAs in the non-invasive diagnostic of bladder cancer	Pág. 53
----------------	---	----------------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** Incidência mundial de câncer de bexiga no ano de 2022 **Pág. 15**

CAPÍTULO 1

- Figura 1** Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagem T24 após o tratamento com extrato de semente de *Euterpe oleracea* Mart. procedente de São Luís (EOSL); A: EOSL não filtrado; B: EOSL filtrado **Pág. 33**
- Figura 2** Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagem T24 após o tratamento com extrato de semente de *Euterpe oleracea* Mart. procedente de Presidente Juscelino (EOJ); A: EOJ não filtrado; B: EOJ filtrado **Pág. 34**
- Figura 3** Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagem T24 após o tratamento com extrato de casca de caule de *Geissospermum vellosii* (PP) **Pág. 35**
- Figura 4** Curva dose-resposta e concentração inibitória média (IC50): após 24 horas de tratamento com EOSL filtrado (A); após 24 horas de tratamento com EOJ filtrado (B); após 48 horas de tratamento com extrato de PP (C) **Pág. 36**
- Figura 5** Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-), tratadas com cisplatina (CPT) a 5 μ M e tratadas com extrato de *G. vellosii* (PP) a 20, 40 e 60 μ g/ml no tempo zero e 24 horas após tratamento **Pág. 36**
- Figura 6** Análise dos efeitos dos extratos de *E. oleracea* sobre a capacidade de formação de colônias de células T24; A: Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-) e tratadas com EOSL filtrado a 100, 150 e 300 μ g/ml; B: Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-) e tratadas com EOJ filtrado a 100, 150 e 300 μ g/ml; C: Frações de sobrevivência após tratamento **Pág. 38**

CAPÍTULO 2

- Figure 1** Process of selecting papers for systematic review **Pág. 51**
- Figure 2** Quality assessment of included articles using JBI checklist for case control studies **Pág. 52**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (área sob a curva)
AY-27	Linhagem celular urotelial de câncer de bexiga de rato
A549	Linhagem celular epitelial de câncer de pulmão
BC/BCa	Câncer de bexiga
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CBMI	Câncer de bexiga músculo invasivo
CBNMI	Câncer de bexiga não músculo invasivo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPT	Cisplatina
CR	Cistectomia radical
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGCG	Epigallocatequina-galato
EOJ	Extrato hidroalcolóico da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. proveniente de Presidente Juscelino, MA
EOSL	Extrato hidroalcolóico da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. proveniente de São Luís, MA
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical relacionado ao HPV 18
HepG2	Linhagem celular de câncer hepático
JBI	<i>Joanna Briggs Institute</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa)
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama hormônio dependente
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NCI-H460	Linhagem celular de câncer de pulmão de células grandes
PP	Extrato etanólico da casca do caule de <i>Geissospermum vellosii</i>

QT	Quimioterapia
QTN	Quimioterapia neoadjuvante
RTU	Ressecção transuretral da bexiga
SiHa	Linhagem celular de câncer cervical relacionado ao HPV 16
Tis	Tumor <i>in situ</i>
T24	Linhagem celular de câncer de bexiga de alto grau
VUC	<i>Voided urine cytology</i> (citologia oncológica urinária)

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1 Câncer de Bexiga.....	14
1.2 Biologia e Patologia do Câncer de Bexiga.....	15
1.3 Diagnóstico do Câncer de Bexiga	16
1.4 Tratamentos Convencionais para o Câncer de Bexiga.....	18
1.5 Produtos Naturais no Tratamento do Câncer	20
1.6 Potencial Citotóxico de Extratos Naturais no Câncer de Bexiga	22
1.7 Linhagem Celular T24	23
1.8 Câncer de Bexiga X <i>Euterpe oleracea</i> e <i>Geissospermum vellosii</i> : Perspectivas.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 CAPÍTULO 1: “Efeitos dos extratos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. e <i>Geissospermum vellosii</i> em linhagem celular de câncer de bexiga”	27
3.1 Resumo.....	27
3.2 Introdução	27
3.3 Métodos	28
3.3.1 Confecção dos extratos hidroalcoólicos da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	28
3.3.1.1 Caracterização química dos extratos.....	29
3.3.2 Confecção do extrato etanólico do caule de <i>Geissospermum</i> <i>vellosii</i>	29
3.3.3 Cultivo de linhagem celular T24	30
3.3.4 Confecção das soluções de trabalho	30
3.3.5 Ensaio de viabilidade celular	30
3.3.6 Ensaio de migração celular.....	31
3.3.7 Ensaio clonogênico.....	31
3.3.8 Análise estatística	31
3.4 Resultados	32
3.4.1 Análise dos extratos de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	32
3.4.2 Efeitos dos extratos sobre a viabilidade celular.....	32
3.4.2.1 Extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. proveniente de São Luís (EOSL).....	32
3.4.2.2 Extrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. proveniente de Presidente Juscelino (EOJ).....	33
3.4.2.3 Extrato da casca do caule de <i>Geissospermum vellosii</i> (PP).....	35
3.4.2.4 Curva dose-resposta e Concentração Inibitória Média (IC ₅₀).....	35
3.4.3 Efeitos do extrato da casca do caule de <i>Geissospermum vellosii</i> (PP) sobre a migração celular	36

3.4.4 Efeitos do extratos da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. (EOSL e EOJ) sobre a capacidade de formação de colônias	37
3.5 Discussão.....	39
3.6 Conclusões	42
3.7 Referências	43
4 CAPÍTULO 2: “The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review”	48
4.1 Abstract.....	48
4.2 Introduction	48
4.3 Methods	49
4.3.1 Protocol and registration	49
4.3.2 Data source and search strategy	49
4.3.3 Eligibility criteria	49
4.3.4 Selection of studies.....	50
4.3.5 Data extraction.....	50
4.3.6 Assessment of risk of bias	50
4.4 Results	51
4.4.1 Quality of studies and measure of evidence.....	51
4.5 Discussion.....	54
4.5.1 Detection of miRNA in human fluids.....	54
4.5.2 Panel multi-miRNA.....	55
4.5.3 The use of miRNA as a diagnostic tool in patients with chronic kidney disease	57
4.5.4 Relationship between expression of miRNA and surgical ablation of the tumor.....	57
4.5.5 The use of miRNA associated other diagnostic methods	58
4.5.6 Limitations of the study	59
4.6 Conclusions.....	59
4.7 References.....	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	66
Apêndice A – Cromatogramas dos extratos de semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. provenientes dos quatro municípios maranhenses.....	74
Apêndice B – Análise da espectrometria de massas dos extratos de semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart. provenientes dos municípios de São Luís (EOSL) e Presidente Juscelino (EOJ).....	75
Anexo A – Principais instruções para submissão de manuscritos na Revista Einstein.....	77

Anexo B – Status de Publicação de “The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review” (Capítulo 2) na Revista Einstein	78
--	-----------

1 REFERENCIAL TEÓRICO

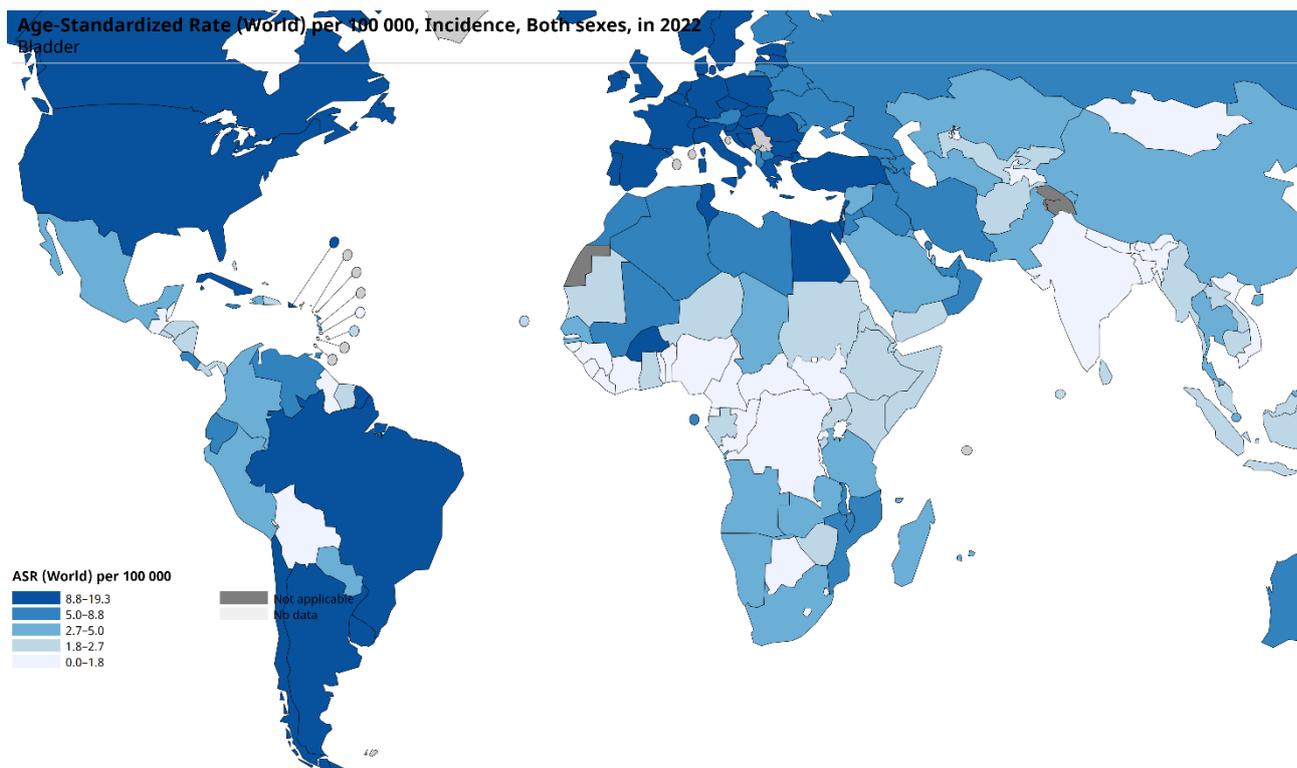
1.1 Câncer de Bexiga

O câncer de bexiga (CB) representa um desafio significativo para a saúde pública global. Estima-se que 20% da população mundial enfrentará algum tipo de neoplasia maligna em suas vidas. O CB posiciona-se como o nono mais prevalente globalmente e o décimo terceiro em termos de mortalidade oncogênica. Anualmente, cerca de 600.000 indivíduos são diagnosticados com esta condição, enquanto aproximadamente 200.000 morrem por ela e suas complicações (GLOBOCAN, 2024). A incidência deste carcinoma é particularmente alta em regiões desenvolvidas, como a Europa, América do Norte e Ásia Ocidental, fato este intimamente associado ao consumo de tabaco, exposição a aminas aromáticas no ambiente de trabalho, ingestão de água contaminada com arsênico, entre outros fatores de risco (Richters *et al.*, 2020).

O tabagismo é o fator mais relevante para o desenvolvimento do câncer na maioria dos países. Cerca de 50% dos casos estão ligados a ele. Isso se deve à exposição do epitélio à urina contendo metabólitos carcinogênicos do tabaco (Freedman *et al.*, 2011). Embora a prevalência do tabagismo esteja em declínio, a diminuição na incidência do carcinoma de bexiga é mais notável entre grupos com maior status socioeconômico, o que reflete uma maior consciência de saúde e acesso a cuidados médicos nesses segmentos da população (Dai *et al.*, 2022).

Observa-se disparidade de gênero em estudos envolvendo este tipo de câncer, com os homens sendo desproporcionalmente mais afetados numa razão de aproximadamente 4:1 em comparação às mulheres. O CB tende a afetar principalmente indivíduos na terceira idade, com mais de 90% dos casos manifestando-se em pessoas com mais de 55 anos (Safiri *et al.*, 2021).

Especificamente no Brasil, projeta-se um número anual de 11.370 novos casos entre 2023 e 2025, traduzindo-se em uma incidência de 5,25 casos por 100.000 habitantes. A incidência é mais elevada entre homens, com 7,45 novos casos por 100.000, em contraste com 3,14 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022).



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
 Data version: Globocan 2022 - 08.02.2024
 © All Rights Reserved 2024

International Agency
 for Research on Cancer
 World Health
 Organization

Figura 1: Incidência mundial de câncer de bexiga no ano de 2022. Taxa padronizada por idade (ASR) por 100.000. Extraído de: Cancer TODAY, WHO, 2024.

1.2 Biologia e Patologia do Câncer de Bexiga

A estrutura da bexiga é composta por 5 a 7 camadas de células epiteliais, incluindo o urotélio na superfície, seguido por camadas de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (conhecidos como lâmina própria), feixes de músculos espessos (a muscular própria ou músculo detrusor) e uma camada externa de tecido adiposo perivesical. As células uroteliais são frequentemente a origem do carcinoma de bexiga, sendo o carcinoma urotelial a variante mais prevalente, afetando cerca de 95% dos pacientes (Dancik *et al.*, 2014).

O carcinoma urotelial é classificado como carcinoma de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) – estágios Tis (tumor in situ), Ta e T1 – ou carcinoma de bexiga músculo invasivo (CBMI) – estágios T2 a T4 –, quando a doença avança para a camada muscular própria. As abordagens de tratamento variam significativamente de acordo com a classificação. No espectro CBNMI, os tumores classificados como Ta tendem a ter um prognóstico mais favorável em comparação aos T1 e Tis, com

estratégias terapêuticas distintas para cada subtipo (Partin *et al.*, 2020). Adicionalmente, o carcinoma de bexiga é categorizado por grau, em carcinomas de baixo ou alto grau. Os carcinomas de baixo grau são caracterizados por recorrências frequentes, mas raramente progridem para estágios mais avançados. Por outro lado, os carcinomas de alto grau podem ser tanto CBNMI quanto CBMI, com os casos CBNMI apresentando alto risco de recorrência e progressão para CBMI, demandando um plano de tratamento e monitoramento intensivo (Dancik *et al.*, 2014).

1.3 Diagnóstico do Câncer de Bexiga

A detecção precoce do CB desempenha um papel fundamental no seu manejo, influenciando diretamente o prognóstico e a morbidade associada ao tratamento. A abordagem para a detecção precoce pode ser dividida em duas estratégias principais: o diagnóstico precoce, focado em pacientes que já apresentam sinais e/ou sintomas da doença, e o rastreamento, destinado a uma população específica sem sintomas, mas com maior risco, onde os benefícios dessa prática superam os riscos associados. (WHO, 2007). Os benefícios são o melhor prognóstico da doença, com tratamento mais efetivo e menor morbidade associada. Os riscos ou malefícios incluem os resultados falso-positivos, resultados falso-negativos, o sobrediagnóstico, o sobretratamento e os possíveis riscos do teste elegível (INCA, 2021). Até o momento não há evidência científica suficiente para recomendar o rastreamento do CB (USTaskForce, 2021).

A estratégia de diagnóstico precoce contribui para a redução do estágio de apresentação do câncer (WHO, 2017). O diagnóstico precoce do CB deve ser buscado com a investigação de sinais e sintomas mais comuns como: hematúria macro ou microscópica (sangramento urinário), disúria (desconforto ao urinar), aumento da frequência urinária (INCA, 2021). Cerca de 75% dos pacientes com CB apresentam hematúria macroscópica indolor. Os pacientes também podem apresentar hematúria microscópica, onde o CB é encontrado em 3,3 a 5,2% desses casos, parecendo corresponder a estágios baixos da doença (Cummins, Barone, Ward, 1992; Khadhoury *et al.*, 2021; Ramírez *et al.*, 2016).

O diagnóstico por imagem é fundamental para o estadiamento local e à distância. Durante uma investigação de hematúria, devem ser realizadas imagens

abdominopélvicas, incluindo imagens do trato urinário superior, para avaliar presença de massas vesicais. A urotomografia com e sem contraste intravenoso é preferida (Chang *et al.*, 2017). A ressonância magnética da pelve com e sem contraste intravenoso pode ser considerada para posterior estadiamento local, especialmente em relação à profundidade da invasão da parede da bexiga (Cornelissen *et al.*, 2020).

A cistoscopia é reconhecida como o padrão ouro para o diagnóstico do CB. O emprego da cistoscopia sob iluminação padrão branca constitui a abordagem tradicional na detecção desta neoplasia, embora sua eficácia seja limitada na identificação de certas lesões, como o carcinoma *in situ*, que frequentemente se manifesta através de uma coloração vermelha sutil, dificultando sua distinção de processos inflamatórios (Babjuk *et al.*, 2022).

O diagnóstico se apoia substancialmente na cistoscopia e na análise histológica dos tecidos coletados, seja por ressecção transuretral da bexiga (RTU) em casos de tumores papilares, seja por biópsias múltiplas para o carcinoma *in situ*. Para lesões de natureza papilar, a realização de uma RTU abrangente é vital tanto para o diagnóstico preciso quanto para a determinação do prognóstico do paciente. Em situações onde a ressecção inicial se mostra incompleta, a amostra não contém tecido muscular, ou um tumor T1 é identificado, recomenda-se a execução de uma segunda RTU em um intervalo de 2 a 6 semanas (Babjuk *et al.*, 2022).

Os diferentes estágios tumorais estão vinculados a distintas características genéticas, as quais podem servir como biomarcadores para diagnósticos que requerem intervenções mínimas. A relevância desses biomarcadores no manejo clínico da doença se intensifica conforme a patologia molecular ganha destaque nas etapas de diagnóstico, escolha terapêutica e elaboração do plano de acompanhamento do paciente (Khadhour *et al.*, 2021).

Atualmente, os métodos não invasivos padronizados para o diagnóstico do BC são limitados e não conseguem substituir completamente procedimentos mais invasivos, como a cistoscopia. A análise de células cancerígenas na urina, ou citologia oncológica, é a técnica primária utilizada para identificar o BC através da urina. Embora este método seja altamente específico, sua sensibilidade é baixa, especialmente para tumores de baixo grau, o que destaca a necessidade de buscar biomarcadores alternativos mais eficazes (Erdmann *et al.*, 2020; Ahn *et al.*, 2022).

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, de fita simples,

constituídos por 19 a 22 nucleotídeos que são capazes de regular a expressão gênica (Singh *et al.* 2022). Sua função pode variar entre promover o crescimento do tumor ou suprimi-lo, dependendo do tipo celular e do contexto em que são expressos (Plawgo, Raczynska, 2022). Devido à sua presença abundante em diversos biofluidos, como sangue e urina, os miRNAs emergem como candidatos valiosos para a identificação de novos biomarcadores para o câncer. Especificamente no câncer de bexiga, perfis distintos de miRNA têm sido associados à presença e progressão do tumor, sugerindo um potencial significativo para o avanço no diagnóstico desta doença (Erdmann *et al.*, 2020; Lin, Tsai, 2021).

1.4 Tratamentos Convencionais para o Câncer de Bexiga

Baseando-se no risco individual de avanço da doença, pacientes com CBNMI são classificados em grupos de risco baixo, intermediário, alto ou muito alto, o que é crucial para orientar a escolha do tratamento adjuvante. Para indivíduos com tumores de baixo risco e recorrências papilares menores identificadas após mais de um ano de uma RTU prévia, é aconselhada uma instilação imediata de quimioterapia (QT). Aqueles com tumores de risco intermediário devem ser submetidos a um ano de imunoterapia intravesical com o bacilo Calmette-Guérin (BCG) em dose plena ou a instilações de quimioterapia por um período de até um ano. Pacientes com tumores de alto risco são indicados a receber a dose completa de BCG intravesical por um período de 1 a 3 anos. Para os pacientes com um risco extremamente alto de progressão do tumor, deve-se considerar a realização imediata de uma cistectomia radical (CR). A CR também é recomendada para tumores resistentes ao tratamento com BCG (Babjuk *et al.*, 2022). A escassez intermitente de BCG, um problema global desde 2013, destaca a necessidade premente de alternativas terapêuticas (Balasubramanian *et al.*, 2022).

Em situações de CBMI e metastático, a CR com dissecação de linfonodos permanece como a abordagem recomendada para o CBMI, sendo precedida de quimioterapia neoadjuvante (QTN) em pacientes elegíveis. Alguns podem se beneficiar de uma CR que preserva aspectos da função sexual, embora essa não seja a estratégia padrão recomendada. Caso a preservação da bexiga seja viável, a quimiorradiação surge como uma alternativa para pacientes criteriosamente

selecionados, sem Tis e após uma RTU máxima (tratamento trimodal que consiste em RTU máxima seguida de quimiorradiação). A quimioterapia adjuvante (QTA) deve ser considerada quando a QTN não for administrada previamente. A imunoterapia perioperatória é uma opção para pacientes com expressão positiva de PD-L1, proteína tumoral relacionada a inibição de resposta imune, crescimento tumoral e metástase. Em casos de expressão negativa de PD-L1, a carboplatina pode ser utilizada. Para a segunda linha de tratamento em doença metastática, o pembrolizumabe é recomendado. A cirurgia pós-quimioterapia pode aumentar a sobrevida em pacientes que respondem ao tratamento. O monitoramento da qualidade de vida é imperativo em todas as etapas do tratamento e acompanhamento. Para pacientes metastáticos elegíveis, a quimioterapia baseada em cisplatina é a escolha primária (Witjes *et al.*, 2021).

A cisplatina, um complexo inorgânico neutro, induz seus efeitos biológicos por meio da interação com o DNA, desencadeando reparo de danos ao DNA, sobrevivência celular ou ativação da apoptose. Para interagir com o DNA, a cisplatina precisa ser ativada por uma série de reações, substituindo seus ligantes de cloro por moléculas de água. A forma monoaquada, extremamente reativa, é crucial para a interação com o DNA, mas sua formação é limitada pela interação com proteínas, DNA e antioxidantes celulares como a glutatona, metionina, metalotioneína, implicando na potencial inativação citoplasmática da cisplatina por esses componentes intracelulares (el Khateeb *et al.*, 1999).

A toxicidade da cisplatina é majoritariamente atribuída à sua capacidade de interagir com sítios nucleofílicos em bases purínicas do DNA, levando à formação de adutos DNA-proteína e de ligações cruzadas intra e intercadeias de DNA (Eastman, 1987). Contudo, predomina a evidência de que os adutos intracadeias são primariamente responsáveis pelos efeitos citotóxicos da droga (Pinto, Lippard, 1985). A ativação dos mecanismos de sinalização ATR/ATM/Chk1/Chk2 desencadeia vias pró-apoptóticas mediadas por p53 que culminam nas mitocôndrias, embora a indução de morte celular independente de p53 também seja uma realidade, corroborando a aplicabilidade da cisplatina em tumores tanto com p53 selvagem quanto mutante. A eficácia aumentada da cisplatina em células com p53 mutante realça sua dependência do dano ao DNA para promover citotoxicidade (Sangster-Guity, Conrad, 2011). A indução de morte celular ocorre quando o estresse mitocondrial facilita a liberação de

elementos cruciais ao apoptossomo, tais como citocromo C e fator indutor de apoptose, desencadeando a ativação de caspases executoras (3/7) e resultando em apoptose celular por meio de clivagem irreversível do DNA (Galluzzi *et al.*, 2012).

Apesar da quimioterapia baseada em cisplatina ter se estabelecido como tratamento padrão para o câncer urotelial metastático, uma parcela significativa dos pacientes com câncer de bexiga, especialmente os mais idosos, não se qualifica para tal tratamento (Galsky *et al.*, 2011). Cerca de 50% dos pacientes com câncer de bexiga exibem resistência inicial ou adquirida à quimioterapia com cisplatina ao longo do tratamento (Kurtova *et al.*, 2015).

1.5 Produtos Naturais no Tratamento do Câncer

A vasta biodiversidade vegetal do Brasil detém um significativo potencial farmacológico, devido à presença de compostos em plantas com propriedades bioativas, aplicáveis na produção de medicamentos (Awuchi, 2019). Estudos têm demonstrado que o consumo de frutas e hortaliças leva à redução do risco de câncer. Essa propriedade está ligada à concentração de fitoquímicos, compostos com potencial ação antioxidante e antiproliferativa, com capacidade de suprimir a progressão e a promoção de carcinogênese, interferindo em várias vias de sinalização envolvendo estresse oxidativo, inflamação e a proliferação celular, induzindo à parada do ciclo celular e à apoptose (Klaunig, Kamendulis, 2004; Brown *et al.*, 2012).

Os produtos naturais constituem uma fonte alternativa de tratamento amplamente reconhecida, valorizada por sua vasta diversidade estrutural e seus mecanismos biológicos de ação. De fato, compostos derivados de plantas vêm sendo extensivamente aplicados em terapias contra o câncer devido às suas notáveis propriedades anticancerígenas (Kinghorn *et al.*, 2009; Fridlender *et al.*, 2015). Diversos compostos derivados de plantas com propriedades anticancerígenas foram descritos. Estudos mostraram que 74,9% dos novos medicamentos antineoplásicos lançados no mercado entre 1981 e 2010 originou-se de produtos naturais (Newman, Cragg, 2012).

Euterpe oleracea pertence à família Arecaceae, representada por cerca de 200 gêneros e 2.600 espécies. *Euterpe oleracea* Mart. é uma espécie monocotiledônea nativa da região amazônica, presente em grande parte do território maranhense.

Segundo último Censo Agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o estado do Maranhão consagra-se como o terceiro maior produtor de açaí do país, sendo um dos únicos com aumento da extração nos últimos anos (Jones, 1995; IBGE, 2017).

A semente do açaí, que constitui aproximadamente 90% tanto do diâmetro quanto do peso total do fruto, resulta em uma grande quantidade de resíduo devido ao aumento da produção desse fruto. Atualmente, apenas um pequeno percentual dessas sementes é aproveitado, seja na alimentação animal ou como adubo em hortas domésticas (Rodrigues *et al.*, 2006). Apesar de não serem comestíveis, as sementes de açaí têm sido objeto de estudos que buscam novos usos para elas, visando não apenas explorar seu potencial de aplicação, mas também minimizar o impacto ambiental associado ao descarte desses resíduos (Barros *et al.*, 2015; Wycoff *et al.*, 2015)

O fruto da *Euterpe oleracea* Mart., conhecido como açaí, é rico em diversos fitoquímicos, incluindo lignanas, compostos fenólicos (antocianinas, proantocianidinas e outros flavonoides) e resveratrol, estando na semente a maior concentração de polifenóis (Ulbricht *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). O consumo do açaí está relacionado à prevenção e redução das doenças cancerígenas, cardiovasculares e circulatórias. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* usando diferentes partes do fruto e da semente apontaram efeitos anticâncer contra diferentes linhagens celulares, reduzindo a viabilidade celular e induzindo mecanismos apoptóticos (Perini *et al.*, 2018; De Almeida Magalhães *et al.*, 2020).

Estudos com método *in vitro* envolvendo extratos de semente de *Euterpe oleracea* já evidenciaram alta atividade antioxidante com redução da viabilidade celular em linhagem celular de câncer de pulmão (A549), atuando diretamente na regulação do ciclo celular, prevenção do crescimento e aumento de células apoptóticas, bem como em linhagem de câncer de mama hormônio dependente (MCF-7), alterando características morfológicas celulares pelo aparecimento de vacúolos autofágicos, possivelmente relacionados ao aumento de espécies reativas de oxigênio (Martinez *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021).

A *Geissospermum vellosii*, uma árvore da Amazônia pertencente à família Apocynaceae e popularmente conhecida como "pau-pereira", tem seu extrato de casca utilizado tradicionalmente na medicina popular sul-americana para o tratamento

de diversas enfermidades, incluindo o câncer (Camargo *et al.*, 2013). Os alcaloides indólicos e beta-carbolínicos, como a geissoschizolina, geissospermina e flavopereirina, são os principais componentes ativos identificados nesses extratos (Puisseux *et al.*, 1959). Estes alcaloides indólicos destacam-se por suas propriedades farmacológicas, incluindo ação antimicrobiana e, notavelmente, antitumoral, o que os torna importantes na elaboração de novos medicamentos e compostos bioativos (Luo *et al.*, 2022). A flavopereirina, em particular, foi pioneiramente reconhecida por suas propriedades anticancerígenas e capacidade de danificar o DNA, junto com outros alcaloides beta-carbolínicos (Beljanski, Beljanski, 1982, 1986; Beljanski, Crochet, Beljanski, 1993). Pesquisas sobre a *G. vellosii* revelaram sua eficácia na supressão de células de câncer de próstata (Bemis *et al.*, 2009) e colorretal (Li *et al.*, 2019), além de demonstrar um efeito inibitório significativo nas células tumorais de ovário, tanto in vitro quanto in vivo. Esse efeito é amplificado quando combinado com a quimioterapia por carboplatina, evidenciando um potencial sinérgico (Yu, Chen, 2014).

1.6 Potencial Citotóxico de Extratos Naturais no Câncer de Bexiga

Organismos vivos são fontes valiosas de produtos naturais com potencial para prevenir ou tratar doenças, incluindo o câncer, devido às suas ações biológicas (Hwang *et al.*, 2019). Vários estudos têm investigado o potencial citotóxico de diferentes extratos em células tumorais, incluindo células de CB.

Lou *et al.* (2010) descobriram que o óleo de *Brucea javanica* induziu a morte celular programada, ou apoptose, em células de câncer de bexiga T24. O tratamento com óleo de *B. javanica* nas concentrações de 0,078 a 5 mg/mL por 48 horas resultou na regulação negativa da expressão de NF- κ B e COX-2, enquanto a expressão das caspases-3 e -9 foi positivamente regulada, conduzindo à apoptose.

Lee *et al.* (2013) mostraram que o extrato de etanol de romã (*Punica granatum*) também induziu apoptose nas células T24. O tratamento com 50 a 100 μ g/mL do extrato por 24, 48, 72 horas ativou a expressão de pró-caspase-3, -8, -9, -12, a razão Bax/Bcl-2, CHOP e Bip. Essas mudanças nas proteínas e genes induziram estresse no retículo endoplasmático, danos mitocondriais e ativação da sinalização do receptor de morte, resultando em apoptose.

Coccia *et al.* (2014) investigaram o efeito anti-metastático dos fenóis presentes

no azeite de oliva extra virgem. O estudo comparou os efeitos do extrato em células T24 de câncer de bexiga e em fibroblastos uroteliais normais sob as mesmas condições. Os resultados mostraram que o extrato inibiu a migração e invasão das células T24, mas não afetou os fibroblastos normais. Isso foi acompanhado pela supressão dos níveis de expressão da MMP-2 (mas não da MMP-9) e pelo aumento dos níveis de expressão dos inibidores de metaloproteinases TIMP-1 e TIMP-2.

Esses estudos exemplificam como compostos bioativos derivados de fontes naturais podem oferecer abordagens promissoras para o tratamento do CB, particularmente pela indução de apoptose e pela inibição das capacidades de migração e invasão de células tumorais.

1.7 Linhagem Celular T24

A linhagem celular T24 é uma ferramenta utilizada em pesquisa devido às suas características particulares que refletem aspectos importantes da biologia do CB. T24 é uma linhagem de carcinoma urotelial de alto grau, caracterizando-se pela invasão do tecido perivesical, pouca diferenciação e alta invasividade, tornando-a um modelo valioso para o estudo de tumores invasivos de CB (Ashfaque *et al.*, 2005).

Essa linhagem celular apresenta mutações no gene p53, um regulador chave da resposta celular ao dano no DNA, desempenhando um papel crítico na prevenção do câncer ao induzir a parada do ciclo celular ou a apoptose em células com DNA danificado. A perda de função p53 na linhagem T24 contribui para a sua capacidade de proliferação descontrolada e resistência à morte celular programada, aspectos típicos das células cancerígenas (Piazza *et al.*, 2001).

Além disso, a linhagem T24 carrega o proto-oncogene HRAS mutado. O gene HRAS é um membro da família RAS de proto-oncogenes, que codifica uma proteína GTPase envolvida na transmissão de sinais que controlam a proliferação celular. Mutação neste gene pode levar a uma ativação constitutiva das vias de sinalização que promovem o crescimento e a divisão celular, contribuindo assim para a oncogênese. As mutações no HRAS são particularmente significativas no contexto do câncer de bexiga, onde estão associadas não apenas à tumorigênese, mas também à progressão do tumor e à recorrência após o tratamento (Piazza *et al.*, 2001).

Portanto, a linhagem T24 é instrumental no estudo do CB, especialmente para

entender os mecanismos moleculares subjacentes à invasividade, progressão e resistência ao tratamento. Investigar essas células permite aos pesquisadores identificar alvos potenciais para terapias mais eficazes e personalizadas contra o CB.

1.8 Câncer de bexiga X *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii*: Perspectivas

O diagnóstico do câncer de bexiga enfrenta consideráveis desafios devido à dependência de métodos diagnósticos significativamente invasivos, como a cistoscopia, que, apesar de eficaz, pode ser desconfortável e apresentar riscos associados. Além disso, as técnicas de imagem convencionais, embora úteis, muitas vezes não são suficientes para detectar tumores em estágios iniciais ou avaliar precisamente a extensão do câncer (Babjuk *et al.*, 2022). Essa limitação no diagnóstico precoce e preciso contribui para a detecção tardia da doença, quando as opções de tratamento podem ser mais limitadas e menos eficazes, sublinhando a necessidade de desenvolver métodos diagnósticos menos invasivos e mais sensíveis. Adicionalmente, os tratamentos para o CB, especialmente em estágios mais avançados, frequentemente envolvem abordagens agressivas, como a CR e a QT, que além de terem um alto custo financeiro, comprometem a qualidade de vida dos pacientes. Essas intervenções podem levar a complicações significativas e pode apresentar elevado grau de morbimortalidade (Galsky *et al.*, 2011).

Euterpe oleracea e *Geissospermum vellosii* são espécies brasileiras, encontradas na Amazônia maranhense, que vêm despertando interesse científico na pesquisa de tratamentos antineoplásicos. *E. oleracea* é rica em polifenóis e o *G. vellosii*, em alcaloides indólicos, classes de compostos com reconhecidas atividades antineoplásicas (Silva *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019). A literatura científica apresenta uma lacuna significativa no que diz respeito à investigação dos potenciais efeitos anticancerígenos desses extratos na terapia contra o CB. Apesar de estudos preliminares em outras formas de câncer sugerirem que compostos bioativos presentes nesses extratos possam ter propriedades antiproliferativas, a pesquisa específica focada na eficácia e mecanismo de ação desses extratos contra células cancerígenas de bexiga é escassa. Essa deficiência de dados impede a compreensão completa do potencial terapêutico que essas plantas podem oferecer, sublinhando a

necessidade urgente de estudos aprofundados que explorem sua viabilidade e segurança como alternativas ou complementos aos tratamentos convencionais para o CB.

Diante dessas realidades, torna-se imperativo buscar alternativas terapêuticas mais eficientes, menos invasivas e mais acessíveis, além de métodos diagnósticos inovadores que possam identificar a doença em estágios iniciais. Deve-se desenvolver novas terapias, incluindo aquelas baseadas em produtos naturais, que possam potencialmente substituir e/ou reverter a resistência à cisplatina e, assim, melhorar a eficácia terapêutica.

Dada tamanha importância da pesquisa com produtos naturais na promoção da saúde e de resultados preliminares promissores, buscou-se, com este estudo, analisar os efeitos de extratos de *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* em linhagem celular de câncer de bexiga de alto grau, bem como buscar na literatura o uso de miRNAs como biomarcadores, com a perspectiva de obter alternativas no diagnóstico, quimioprevenção e quimioterapêutica desse tipo de câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial citotóxico dos extratos da semente de *Euterpe oleracea* Mart. e da casca do caule de *Geissospermum vellosii* em linhagem celular de câncer de bexiga.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade celular após o tratamento da linhagem celular de câncer de bexiga com os extratos em diferentes concentrações;
- Investigar os efeitos do extrato da casca do caule de *G. vellosii* sobre a capacidade de migração celular após o tratamento;
- Analisar os efeitos do extrato da semente de *E. oleracea* Mart. sobre a capacidade de formação de colônias após o tratamento;
- Comparar a ação citotóxica dos extratos à da cisplatina em células de câncer de bexiga;
- Buscar na literatura o uso de miRNAs como biomarcadores não invasivos no diagnóstico de câncer de bexiga.

3 CAPÍTULO 1: “Efeitos dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart. e *Geissospermum vellosii* em linhagem celular de câncer de bexiga”

3.1 Resumo

Objetivo: Analisar a citotoxicidade de extratos de *Euterpe oleracea* Mart. e de *Geissospermum vellosii* em linhagem celular de câncer de bexiga de alto grau.

Métodos: Células T24 foram cultivadas em meio McCoy's, semeadas em placas de 96 poços e tratadas com extrato de *G. vellosii* (5 – 100 µg/mL) e extrato de *E. oleracea* (50 - 1000 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade foi avaliada com teste do MTT. Na migração celular, células foram semeadas em placas de 96 poços e, após confluência, realizada ranhura em cada poço, seguida de registros fotográficos. Novos registros foram realizados 24h após tratamentos com extrato de *G. vellosii*.

Resultados: Extratos de *E. oleracea* (IC₅₀ = 171,1 e 133 µg/mL) e de *G. vellosii* (IC₅₀ = 24,36 µg/mL) inibiram a viabilidade celular em linhagem T24 de modo tempo e concentração-dependente. *G. vellosii* reduziu também a capacidade migratória de T24 de modo concentração-dependente, sendo mais eficaz que a cisplatina (5 µM), com fechamento completo da ranhura para controle e cisplatina, e de 81,8 ± 0,3% (20 µg/mL), 62,2 ± 9,4% (40 µg/mL) e 23,8 ± 6,5% (60 µg/mL) para o extrato após 24h de tratamento. **Conclusões:** *G. vellosii* e *E. oleracea* foram capazes de reduzir a viabilidade celular e, *G. vellosii*, a capacidade migratória de T24, demonstrando potencial antitumoral em câncer de bexiga humana.

Palavras-chave: Produtos Naturais; Antineoplásicos; Neoplasias de Bexiga Urinária.

3.2 Introdução

O câncer de bexiga (CB) posiciona-se como o nono mais prevalente globalmente e o décimo terceiro em termos de mortalidade oncogênica⁽¹⁾. As células uroteliais são frequentemente a origem do carcinoma de bexiga, sendo o carcinoma urotelial a variante mais prevalente, afetando cerca de 95% dos pacientes.⁽²⁾

A detecção precoce do CB é fundamental no seu manejo, influenciando diretamente o prognóstico e a morbidade associada ao tratamento.⁽³⁾ As modalidades

de tratamento variam de acordo com a invasividade do tumor, entretanto, envolvem terapias desconfortáveis e potencialmente radicais, como cirurgia de grande porte, a cistectomia. Para pacientes metastáticos elegíveis, a quimioterapia baseada em cisplatina é a primeira escolha.⁽⁴⁾

Euterpe oleracea e *Geissospermum vellosii*, espécies nativas da região amazônica do Maranhão, Brasil, têm emergido como focos de interesse científico para o desenvolvimento de tratamentos antineoplásicos. *E. oleracea* é enriquecida com polifenóis, enquanto *G. vellosii* é fonte de alcaloides indólicos, ambos reconhecidos por suas propriedades antineoplásicas.⁽⁵⁾⁽⁶⁾ Contudo, observa-se uma notável insuficiência na literatura científica quanto à investigação dos efeitos anticancerígenos destes extratos no tratamento do CB. Embora estudos iniciais em variados tipos de câncer indiquem que os compostos bioativos contidos nesses extratos possam exibir propriedades antiproliferativas, a investigação focada em sua eficácia e mecanismo de ação contra o câncer de bexiga permanece limitada.

Considerando a importância crítica da investigação em produtos naturais para a promoção da saúde e face aos resultados preliminares encorajadores, o presente estudo visa explorar os efeitos de extratos de *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* em células de câncer de bexiga de alto grau.

3.3 Métodos

3.3.1 Confeção dos extratos hidroalcoólicos da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

Utilizaram-se amostras do fruto nativo de *E. oleracea* coletadas nos municípios maranhenses de São Luís, Axixá, Morros e Presidente Juscelino. Além dos frutos, foram coletadas folhas e flores para confecção das exsiccatas. A amostra do exemplar encontra-se no Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão, registrada sob laudo de número 30.

Os frutos foram higienizados com solução de hipoclorito e água destilada, pesados e despulpados e as sementes lavadas com água destilada, para remoção da polpa, secadas e acondicionadas em estufa. Realizou-se remoção das fibras até obtenção de sementes de aspecto fosco e liso, as quais foram trituradas até obtenção

de pó. O pó da semente foi submetido a percolação alcoólica, até obtenção de extratos líquidos. Os extratos de cada município foram submetidos a rotaevaporação, para remoção do álcool, e liofilização, para remoção da água. Os extratos liofilizados foram pesados e acondicionados em ultrafreezer, à temperatura de -80 °C, até o uso nas células. Todas as etapas de produção foram descritas detalhadamente por Pinto.⁽⁷⁾

A pesquisa foi aprovada pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), cadastrada sob código AF1ABAE.

3.3.1.1 Caracterização química dos extratos

Uma amostra de cada extrato foi separada para a caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como teste de triagem (Apêndice A). Realizou-se cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS) dos extratos correspondentes a São Luís (EOSL) e Presidente Juscelino (EOJ), quimicamente diferentes naquele primeiro método, a fim de separar os extratos em seus componentes constitutivos. As análises químicas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química dos Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão, sob coordenação da Dra. Claudia Quintino. A espectrometria de massas foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.3.2 Confeção do extrato etanólico do caule de *Geissospermum vellosii*

O extrato etanólico derivado da casca do caule de *G. vellosii* (PP), obtido do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, foi empregado neste estudo. As metodologias adotadas para o preparo e análise química do extrato estão descritas nos trabalhos de Lima et al.⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ Para os ensaios, o extrato liofilizado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) anidro, e a partir dessa solução-mãe, foram preparadas diluições nas concentrações desejadas para os testes subsequentes.

3.3.3 Cultivo de linhagem celular T24

Para a avaliação biológica dos extratos, foi utilizada a linhagem de carcinoma urotelial de bexiga grau 3, T24, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas seguindo normas da American Type Culture Collection (ATCC®), em meio McCoy's 5A contendo L-glutamina, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos – penicilina G a 60 mg/L e estreptomicina a 100 mg/L –, em frascos de cultivo mantidos a 37°C e 5% de CO₂.

3.3.4 Confeção das soluções de trabalho

Os extratos liofilizados foram inicialmente solubilizados em DMSO, atingindo uma concentração de 100mg/ml. A partir dessa solução-mãe, procedeu-se à preparação de diluições nas concentrações específicas para avaliação, utilizando como diluente o meio McCoy's 5A não suplementado. Adicionalmente, uma solução de cisplatina a 5 µM foi preparada para servir como referência comparativa à atividade dos extratos. As soluções de trabalho de EOSL e EOJ foram submetidas a processo de filtração, com o intuito de investigar sua influência no desempenho dos extratos. Foi utilizado filtro de seringa com poros de 0,22 µm. Portanto, realizou-se testes com extratos filtrados e não filtrados.

3.3.5 Ensaios de viabilidade celular

As células foram adicionadas a placas de 96 poços, contendo 1x10⁴ células/poço. Foram tratadas com EOSL e EOJ em diferentes concentrações (50, 100, 150, 300, 500, 700, 1000 µg/mL), com PP (5, 10, 20, 40, 60, 100 µg/mL) e com cisplatina (5 µM) por 24, 48 e 72 horas. Foram reservados poços contendo células sem tratamento – controle –, bem como poços que continham células tratadas com DMSO a 0,1%, 0,5%, 0,7% e 1% – veículos. Após o tratamento, os poços receberam adição de meio suplementado e brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As amostras foram incubadas por 3 horas em estufa protegida da luz. Adicionou-se álcool etílico absoluto para eluição dos cristais de formazana. A leitura da absorbância dos cristais foi realizada utilizando o leitor de ELISA *Epoch BioTek Instruments*, com comprimento de onda de 570 nm. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.6 Ensaio de migração celular

Foram semeadas células em placas de 96 poços, contendo inicialmente 1×10^5 células/poço. Após confluência, realizou-se ranhura utilizando ponteira de 10 μL na monocamada de cada poço para registro fotográfico imediato (tempo zero). Foram adicionados PP a 20, 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$, e cisplatina a 5 μM . Novos registros fotográficos foram realizados 24 horas após o tratamento. As fotografias foram feitas com o auxílio de um microscópio invertido *Axio Observer Z1* equipado com uma câmera fotográfica *Axiocam HRc Ver.3* com objetiva de 10x. As imagens foram adquiridas por meio do software *Axiovision Release*. As áreas das ranhuras foram determinadas utilizando o software *ImageJ*. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.3.7 Ensaio clonogênico

As células foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo 600 células/poço. Após 24 horas do plaqueamento, foi verificada a adesão celular. Foram adicionados EOSL e EOJ a 100, 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$ aos poços, tratados por 48 horas. Após esse período, foi removido o tratamento e os cultivos foram mantidos em condições usuais durante 7 dias, com trocas de meio a cada 48-72 horas.

Após 7 dias de cultivo, as colônias foram fixadas em álcool etílico absoluto (200 μL) por 15 minutos, seguido de sua remoção e secagem. Em seguida, adicionou-se 300 μL de solução de cristal violeta a 0,5% durante 30 minutos. Após captura de imagens, adicionou-se 500 μL de metanol por 5 minutos, coletou-se 200 μL do eluato e realizou-se a medida de absorvância usando espectrofotômetro *Epoch BioTek Instruments* e o software *Agilent BioTek Gen5*, com comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.8 Análise estatística

Foi realizado teste *one-way analysis of variance* (ANOVA), bem como testes de comparação múltipla de Dunnett. Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Para realização da análise, foi utilizado o programa

GraphPad Prism versão 8.0.2 para Windows.

3.4 Resultados

3.4.1 Análise dos extratos de *Euterpe oleracea* Mart.

A espectrometria de massas demonstrou que o extrato proveniente da semente do fruto coletado em São Luís (EOSL) apresentou 16 picos, sendo os principais compostos pertencentes aos grupos das catequinas e procianidinas. Enquanto o extrato da semente advinda de Presidente Juscelino (EOJ) apresentou 18 picos, composto por catequinas e procianidinas, além de quantidades-traço de cafeoilglicose e epigalocatequina-galato (Apêndice B).

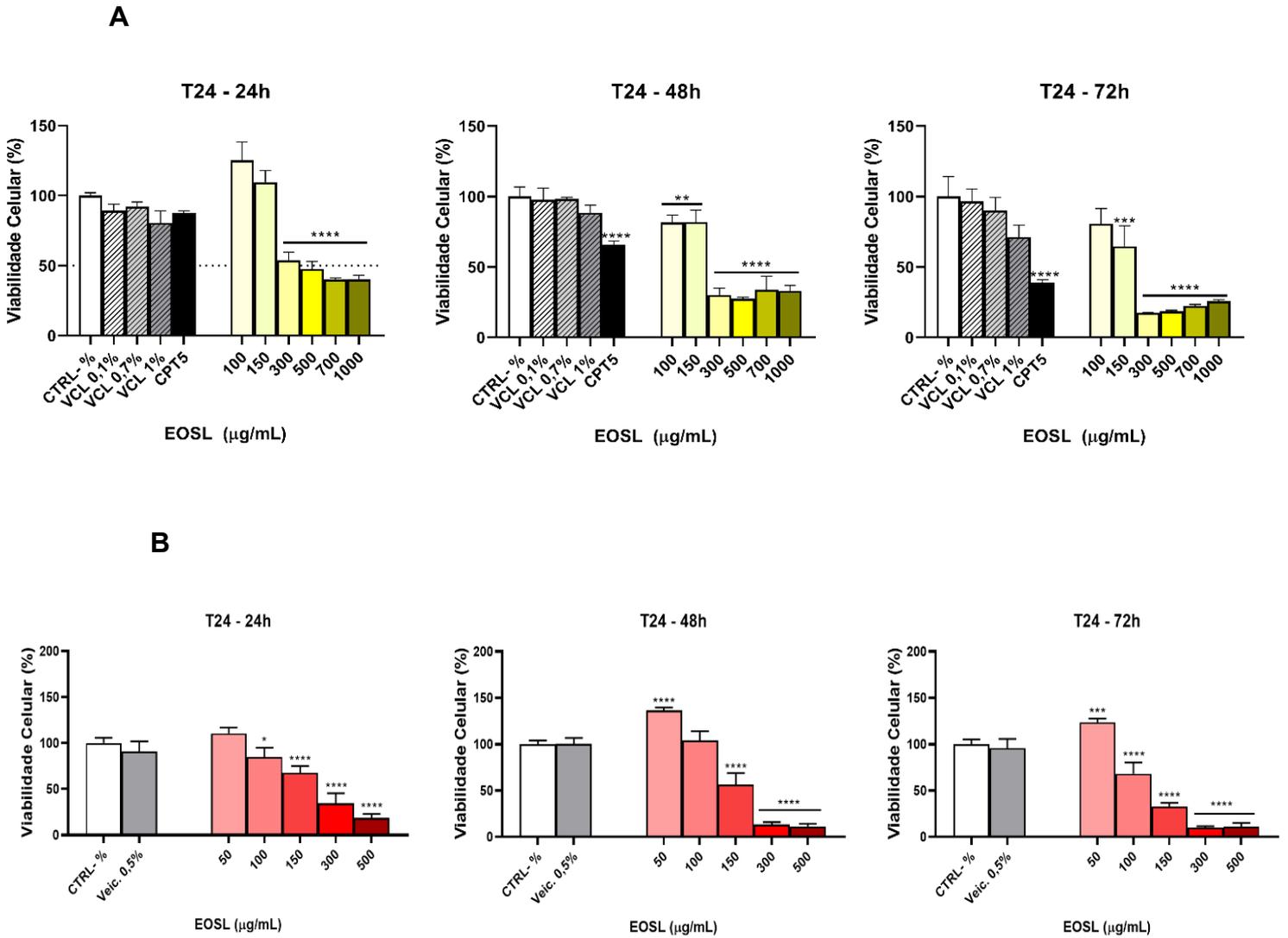
3.4.2 Efeitos dos extratos sobre a viabilidade celular

3.4.2.1 Extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. proveniente de São Luís (EOSL)

Inicialmente, foram realizados testes de MTT em tratamento com EOSL não filtrado nas concentrações 100, 150, 300, 500, 700 e 1000 µg/ml. Observou-se efeito proliferativo do extrato nas primeiras 24 horas em concentrações menores – 100 e 150 µg/ml – e efeito citotóxico a partir de 300 µg/ml. Entretanto, 48 e 72 horas após o tratamento, destaca-se tendência à redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas, dependente do tempo de tratamento. Em concentrações mais elevadas, o EOSL não filtrado mostrou-se mais citotóxico quando comparado à cisplatina.

A partir dos primeiros resultados, foram realizados novos testes com EOSL filtrado a 50, 100, 150, 300 e 500 µg/ml. Houve efeito proliferativo quando as células foram expostas à menor concentração, independente do tempo de tratamento. Nas demais concentrações, evidenciou-se efeito citotóxico do extrato com redução expressiva da viabilidade celular, relacionada à concentração e ao tempo de tratamento, com resultados estatisticamente significativos. Houve impacto na ação do extrato filtrado quando comparada à do extrato não filtrado em concentrações

semelhantes, sendo possível observar aumento da citotoxicidade após a filtração.



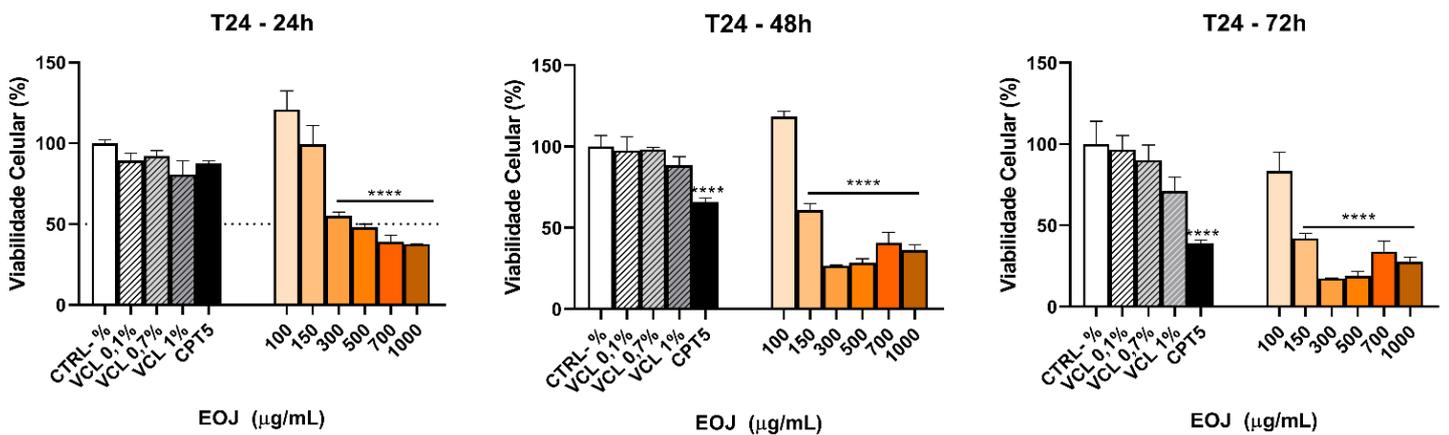
3.4.2.2 Extrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart. proveniente de Presidente Juscelino (EOJ)

Em testes com EOJ não filtrado, semelhantemente ao EOSL, evidenciou-se efeito proliferativo do extrato nas primeiras 24 horas, quando em tratamento a 100 e 150 µg/ml. Tal efeito foi mantido após 48 horas na menor concentração. Entretanto, 48 e 72 horas após o tratamento, destaca-se tendência à redução da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Observou-se intensificação desse efeito

com o aumento do tempo de tratamento. Em concentrações mais elevadas, o EOJ não filtrado também se mostrou mais citotóxico quando comparado à cisplatina.

Após realização de testes com EOJ filtrado, observou-se efeito proliferativo progressivo em tratamento com EOJ a 50 µg/ml em 24, 48 e 72 horas. Nas demais concentrações, evidenciou-se ação citotóxica tempo e concentração dependente. Após a filtração, notou-se aumento do potencial de citotoxicidade do extrato. Quando comparado ao EOSL, o EOJ demonstrou maior redução da viabilidade celular em menores concentrações.

A



B

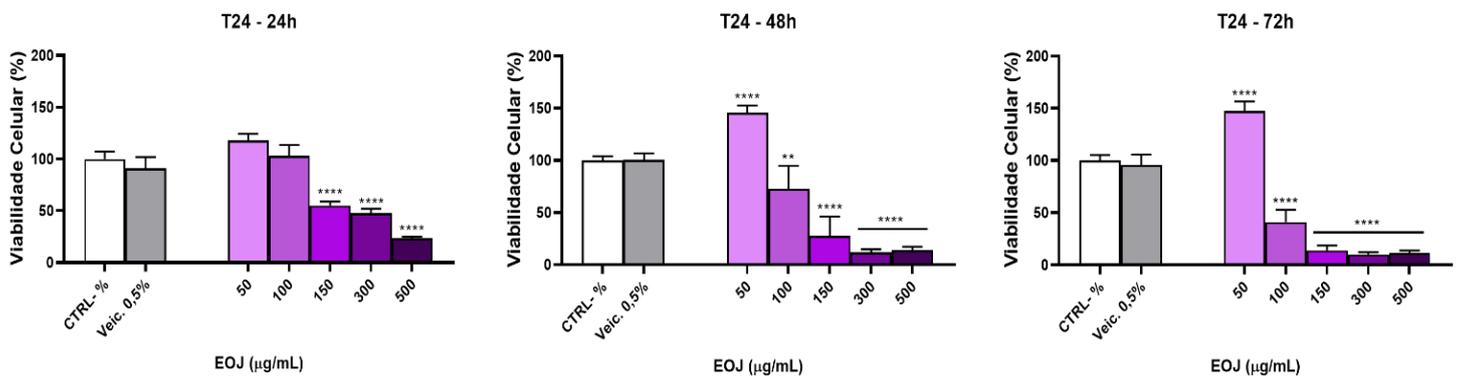


Figura 2: Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagem T24 após o tratamento com extrato de semente de *Euterpe oleracea* Mart. procedente de Presidente Juscelino (EOJ); A: EOJ não filtrado; B: EOJ filtrado. Análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. CTRL -: células sem tratamento; VCL/Veic.: veículo; CPT5: cisplatina a 5 µM

3.4.2.3 Extrato da casca do caule de *Geissospermum vellosii* (PP)

O extrato de PP reduziu a viabilidade celular de forma tempo e concentração-

dependente após tratamento da linhagem T24 em baixas concentrações. Observou-se redução significativa desde as primeiras 24 horas nas maiores concentrações testadas (60 e 100 µg/ml). Após 48 e 72 horas, notou-se intensificação do efeito, com resposta estatisticamente significativa a partir de 20 e 10 µg/ml, respectivamente.

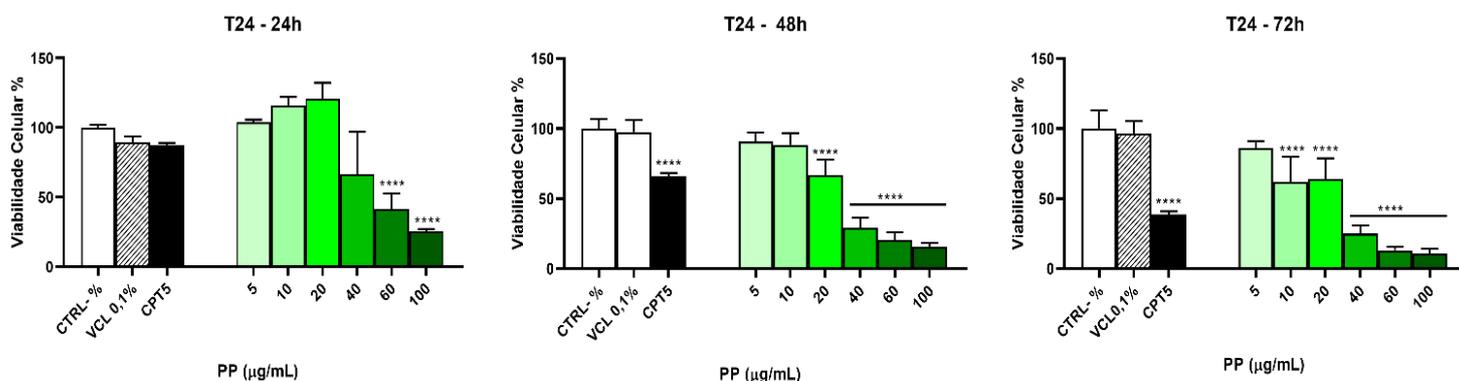


Figura 3: Teste de viabilidade celular (MTT) em linhagem T24 após o tratamento com extrato de casca de caule de *Geissospermum vellosii* (PP). Análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Dunnett. **** $p < 0,0001$. CTRL -: células sem tratamento; VCL: veículo; CPT5: cisplatina a 5 µM

3.4.2.4 Curva dose-resposta e Concentração Inibitória Média (IC₅₀)

A IC₅₀ representa a concentração do composto necessária para inibir 50% da viabilidade celular em comparação com as células não tratadas, servindo como um indicador da potência do composto. Foram avaliados os efeitos de dois extratos filtrados, EOSL e EOJ, e também de PP, em um determinado modelo celular após períodos de tratamento de 24 horas (para EOSL e EOJ) e 48 horas (para PP).

Os resultados obtidos mostraram que EOSL apresentou uma IC₅₀ de 171,1 µg/ml após 24 horas de tratamento. EOJ mostrou uma IC₅₀ um pouco menor, de 133 µg/ml, também após 24 horas de tratamento. Esse valor sugere que o EOJ pode ser ligeiramente mais potente que o EOSL na inibição da viabilidade celular.

Para PP, a IC₅₀ determinada foi de 24,36 µg/ml após 48 horas de tratamento. Este valor é significativamente menor que os obtidos para EOSL e EOJ, indicando uma maior potência inibitória de PP na redução da viabilidade celular.

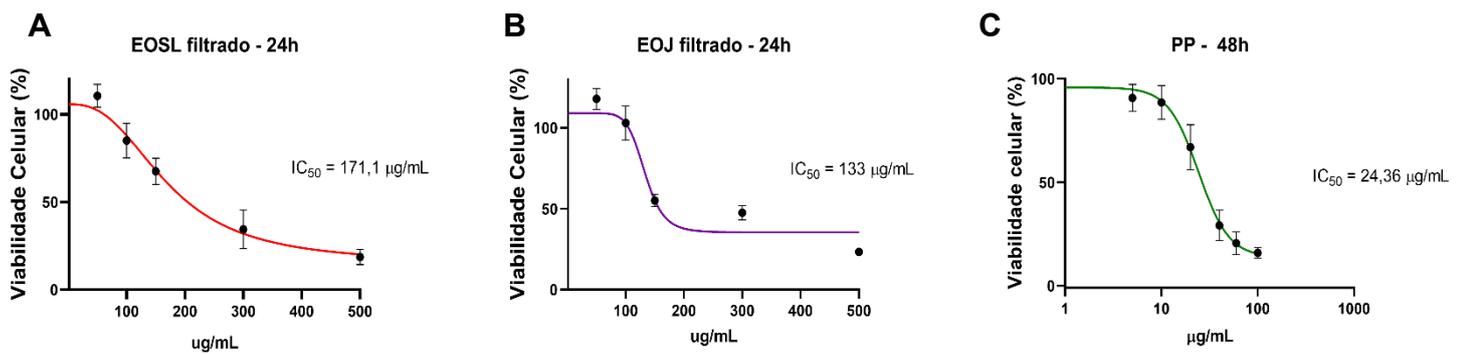


Figura 4: Curva dose-resposta e concentração inibitória média (IC_{50}): após 24 horas de tratamento com EOSL filtrado (A); após 24 horas de tratamento com EOJ filtrado (B); após 48 horas de tratamento com extrato de PP (C)

3.4.3 Efeitos do extrato da casca do caule de *Geissospermum vellosii* (PP) sobre a migração celular

Em análise fotográfica após 24 horas de tratamento com PP (Figura 5), observou-se redução da capacidade migratória de T24 de modo concentração-dependente, sendo mais eficaz que a antineoplásico cisplatina (5 μM). Houve fechamento da ranhura de 100% para controle e cisplatina, e de $81,8 \pm 0,3\%$ (20 $\mu\text{g/mL}$), $62,2 \pm 9,4\%$ (40 $\mu\text{g/mL}$) e $23,8 \pm 6,5\%$ (60 $\mu\text{g/mL}$) para o PP (Tabela 1).

T24

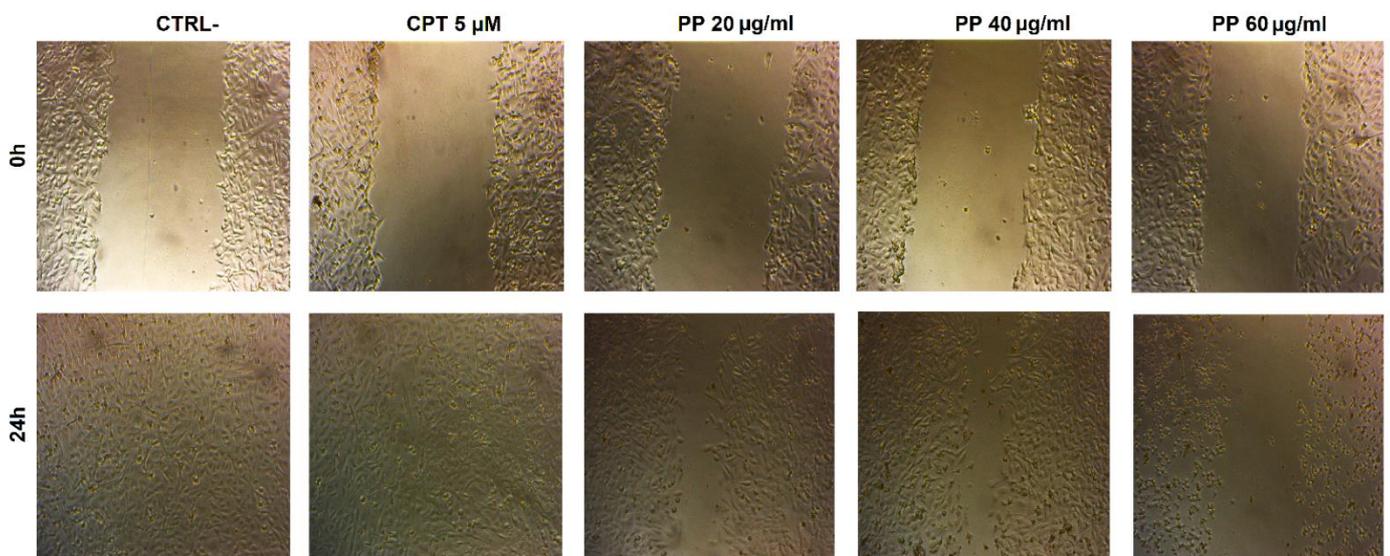


Figura 5: Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-), tratadas com cisplatina (CPT) a 5 μM e tratadas com extrato de *G. vellosii* (PP) a 20, 40 e 60 $\mu\text{g/ml}$ no tempo zero e 24 horas após tratamento. Imagens obtidas a partir de câmera fotográfica *Axiocam*. Objetiva de 10x

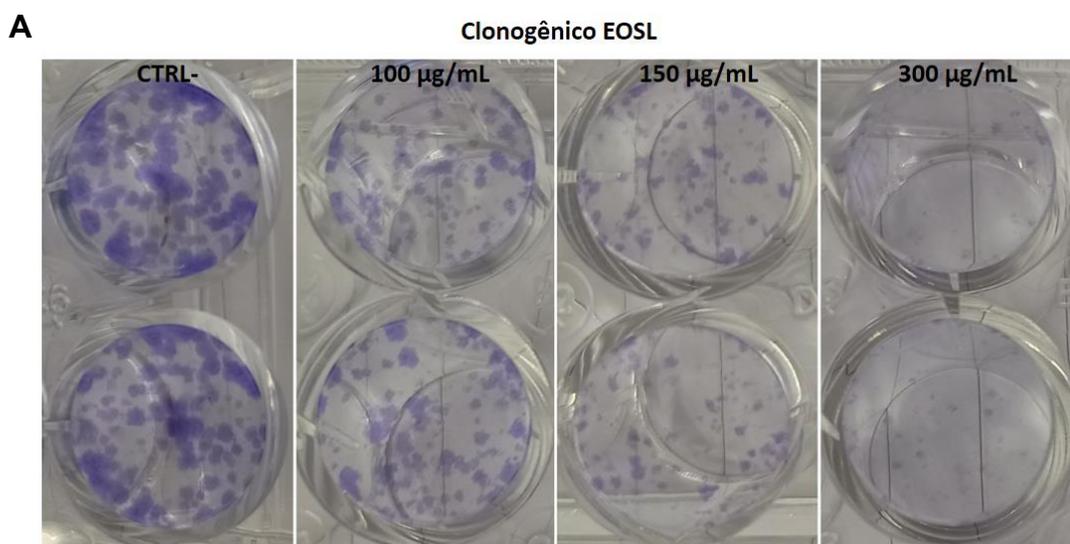
Tabela 1: Fechamento de ranhuras após 24 horas de tratamento com extrato de casca de caule de *Geissospermum vellosii*

T24	Fechamento % $[(T_0-TF/T_0) * 100]$
	Média ± DP
Extrato	24h
CTRL-	100,0 ± 0
CPT 5 µM	100,0 ± 0
PP 20 µg/mL	81,8 ± 0,3
PP 40 µg/mL	62,2 ± 9,4
PP 60 µg/mL	23,8 ± 6,5

T0: medida de área da ranhura no tempo zero; TF: medida de área da ranhura após 24 horas; DP: desvio padrão; CTRL-: controle negativo; CPT: cisplatina; PP: extrato da casca do caule de *G. vellosii*

3.4.4 Efeitos dos extratos da semente de *Euterpe oleracea* Mart. (EOSL e EOJ) sobre a capacidade de formação de colônias

Realizou-se ensaio clonogênico com a finalidade de avaliar a manutenção dos efeitos sobre a redução da viabilidade celular e formação de colônias após remoção do tratamento com EOSL e EOJ. Observou-se capacidade de reduzir a viabilidade celular/formação de novas colônias de modo semelhante em ambos extratos (Figura 6). Foram evidenciados resultados estatisticamente significantes em todas as concentrações testadas, destacando-se maior efeito nas concentrações mais elevadas (300 µg/mL).



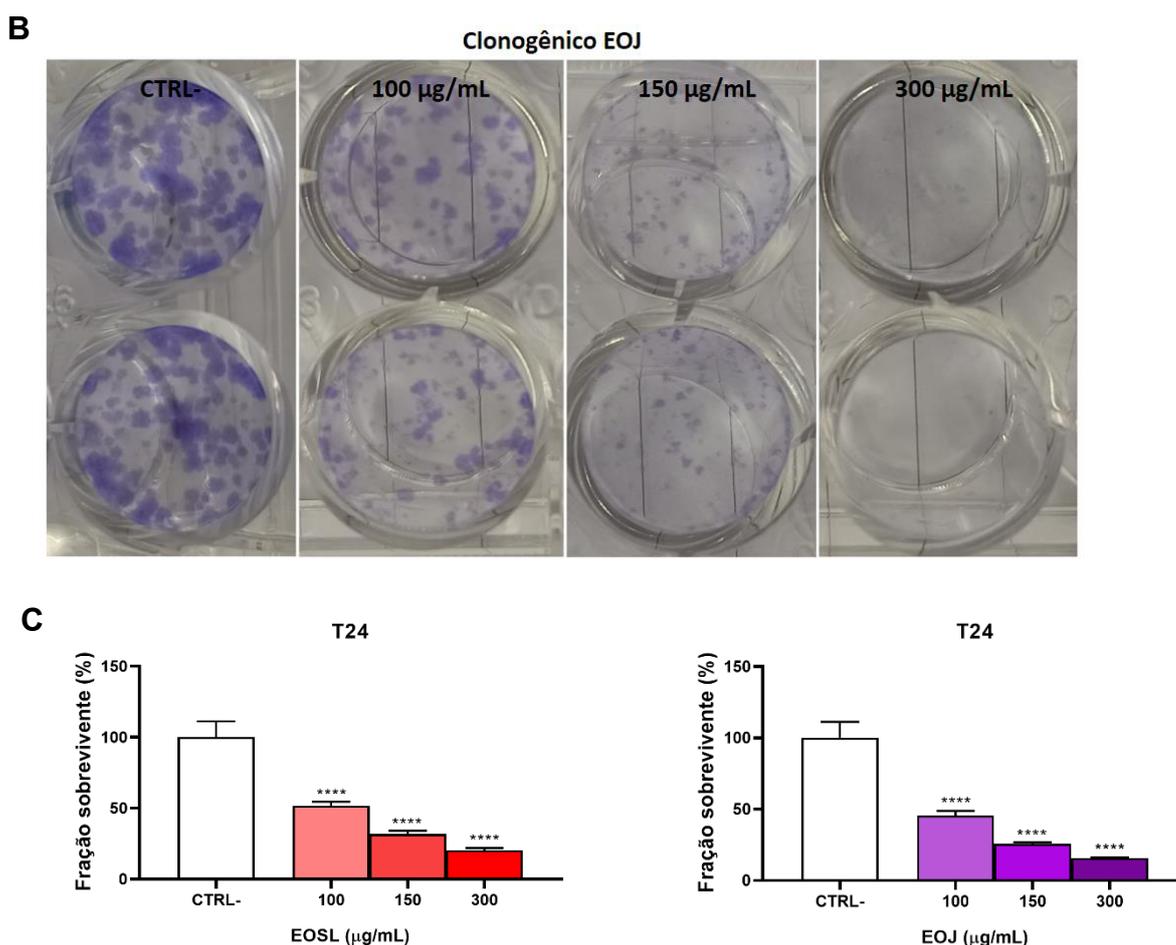


Figura 6: Análise dos efeitos dos extratos de *E. oleracea* sobre a capacidade de formação de colônias de células T24; A: Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-) e tratadas com EOSL filtrado a 100, 150 e 300 µg/ml; B: Registros fotográficos de poços contendo células T24 sem tratamento (CTRL-) e tratadas com EOJ filtrado a 100, 150 e 300 µg/ml; C: Frações de sobrevivência após tratamento. Análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Dunnett. **** $p < 0,0001$

3.5 Discussão

A quimioterapia e a radioterapia são abordagens tradicionais no tratamento de diversos tipos de câncer, embora frequentemente associadas a efeitos colaterais significativos devido à sua citotoxicidade, inclusive para células saudáveis, e à interferência nos processos fisiológicos e vias de sinalização celular. Diante disso, a busca por terapias antitumorais seguras, eficazes e economicamente viáveis mantém-se como uma prioridade na oncologia. Nesse contexto, os produtos naturais emergem como alternativas promissoras, tendo demonstrado potencial na modulação da carcinogênese, no aumento da efetividade de tratamentos convencionais e na

mitigação de suas toxicidades.⁽¹¹⁾

Este estudo centrou-se na avaliação da atividade citotóxica de extratos derivados da semente de *E. oleracea* e da casca do caule de *G. vellosii* contra células de câncer de bexiga invasivo. Análises via espectrometria de massas de dois extratos de *E. oleracea*, oriundos de distintas localidades, revelaram diferenças químicas significativas. O extrato da semente proveniente de São Luís (EOSL) identificou 16 picos, enquanto o de Presidente Juscelino (EOJ) apresentou 18 picos, com predominância de catequinas e procianidinas, além de traços de cafeoil-glicose e epigallocatequina-galato (EGCG) no EOJ. Testes de viabilidade celular indicaram que o EOJ ($IC_{50} = 133 \mu\text{g/ml}$ em 24 horas) exibiu maior atividade citotóxica em comparação ao EOSL ($IC_{50} = 171,1 \mu\text{g/ml}$ em 24 horas), possivelmente devido à sua composição proporcional distinta de flavonoides e à presença de EGCG.

As catequinas e procianidinas, polifenóis com reconhecidas propriedades biológicas, têm atraído a atenção da comunidade científica pelos seus impactos benéficos na saúde humana. Em um estudo conduzido por Meneses-Gutiérrez et al.⁽¹²⁾, investigou-se a eficácia citotóxica de monômeros e oligômeros de catequina e epicatequina em células de câncer de bexiga T24. Observou-se que os oligômeros dessas substâncias reduziram significativamente a viabilidade e a densidade das células T24, evidenciando uma ação citotóxica que varia de acordo com a concentração. A máxima atividade citotóxica foi alcançada com oligômeros a $9 \mu\text{M}$, apresentando eficácia comparável à da cisplatina em $10 \mu\text{M}$. Em uma pesquisa paralela, Liu et al.⁽¹³⁾ exploraram os efeitos do extrato de procianidinas obtido de sementes de uva sobre células de câncer de bexiga, constatando que o extrato suprimiu a proliferação celular, induziu a parada do ciclo celular e a apoptose através da ativação de caspase-3.

Recentemente, alguns estudos investigaram os efeitos do EGCG no câncer de bexiga. Hsieh⁽¹⁴⁾ e Qin⁽¹⁵⁾ relataram que o EGCG é capaz de inibir a proliferação e migração celular em várias linhagens de células de câncer de bexiga, incluindo a T24, incluindo a indução de apoptose através da ativação de proteínas da família Bcl-2. Um estudo conduzido por Kemberling⁽¹⁶⁾ mostrou resultados promissores em um modelo animal, onde o tratamento intravesical com EGCG reduziu o risco de desenvolvimento de tumor AY-27 em ratos em 64% em comparação com um grupo controle não tratado. Isso indica que o EGCG pode ter aplicações terapêuticas potenciais no tratamento do

câncer de bexiga, inclusive como uma forma de terapia localizada. Luo⁽¹⁷⁾ observou que o tratamento com EGCG inibiu a viabilidade das células T24 de maneira dependente da dose e do tempo, com IC₅₀ de 117,8 µM após 48 horas de tratamento. Isso sugere que o EGCG pode ser eficaz em doses específicas, proporcionando uma janela terapêutica potencial para o tratamento do câncer de bexiga.

EOSL e EOJ reduziram a capacidade de formação de novas colônias de células T24 após 48 horas de tratamento nas três concentrações testadas (100, 150 e 300 µg/mL). Resultados diferentes foram encontrados por este grupo em ensaio clonogênico utilizando EOSL a 120 µg/mL em linhagem SiHa após 72 horas. Embora tenha sido capaz de reduzir a viabilidade celular no ensaio de MTT, não houve permanência do efeito após remoção do tratamento.⁽⁷⁾

Estudos foram realizados envolvendo tratamentos com o extrato da semente de açaí em diversas formas de câncer. Martinez et al.⁽¹⁸⁾ investigaram a ação deste extrato em células de carcinoma pulmonar humano (A549), observando uma significativa redução da viabilidade celular após 48 horas de exposição a uma concentração de 200 µg/ml, conforme evidenciado pelo ensaio MTT. De maneira consistente, Barros et al.⁽¹⁹⁾ descobriram que o extrato de semente de açaí exerce um efeito inibitório no crescimento de várias linhagens celulares cancerígenas humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), com destaque para sua eficácia contra o carcinoma cervical (HeLa). A investigação detalhada revelou que o açaí induz a supressão de vias antiproliferativas, interferindo na expressão de proteínas cruciais como PCNA, Ki-67 e p63, conforme relatado por Fragoso⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ e Choi⁽²²⁾. Essas proteínas desempenham papéis fundamentais no crescimento, sobrevivência e metástase tumoral⁽²³⁾⁽²⁴⁾, sublinhando a potencial relevância do açaí como um agente antitumoral.

O extrato obtido da casca do caule de *G. vellosii* destacou-se por seu expressivo potencial citotóxico entre os extratos avaliados, demonstrando um IC₅₀ de 24,36 µg/ml após 48 horas de aplicação. Esse resultado está alinhado com estudos anteriores que investigaram seu potencial citotóxico tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra linhagens de câncer de pâncreas, ovário, colorretal e glioblastoma.⁽²⁵⁾⁽⁶⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾ Rico em alcaloides indólicos, o extrato de *G. vellosii* possui reconhecida atividade antitumoral, conforme documentado por Beljanksi.⁽²⁸⁾

Os mecanismos subjacentes à atividade antitumoral desses alcaloides são

diversificados, incluindo a promoção da apoptose⁽²⁹⁾, a ativação das caspases e a alteração na proporção Bcl-2/Bax, favorecendo a apoptose⁽³⁰⁾, além da interação com microtúbulos, afetando diretamente a migração celular⁽³¹⁾. Um aspecto crucial para a migração celular é a formação de gradientes de proteínas especializadas, como as pequenas Rho-GTPases, com destaque para as proteínas RAC e Rho, que se distribuem de maneira diferenciada ao longo da célula, facilitando a migração celular mediante o uso de ATP e o transporte via microtúbulos.⁽³²⁾ Interessantemente, foi observado que o extrato de *G. vellosii* também inibe a migração das células T24 de maneira dose-dependente, reduzindo a capacidade de fechamento da ranhura a apenas 23,8% na maior concentração testada. Presume-se que haja relação entre a alta concentração desses compostos no extrato e a sua ação inibitória da capacidade de migração das células.

Além disso, é possível considerar que os impactos do PP sejam atribuíveis a mecanismos antitumorais alternativos. Destaca-se que este extrato exibe propriedades anticolinesterásicas e ação antagonista em receptores nicotínicos, conforme apontado por Lima⁽⁸⁾. A relação entre o tabagismo e o desenvolvimento de câncer de bexiga é notória, sendo responsável por mais de 50% dos casos⁽³³⁾. Chen et al.⁽³⁴⁾ foram pioneiros ao demonstrar o impacto direto da nicotina no crescimento de células epiteliais da bexiga. Observou-se que o bloqueio do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) cessou a proliferação das células T24 induzida por nicotina, ressaltando o papel crucial dos receptores nAChR como mediadores da proliferação celular estimulada pela nicotina. Através do uso de inibidores específicos, ficou evidente que diversas vias de sinalização estão envolvidas na amplificação da atividade transcricional de NF- κ B e Stat3, culminando na superexpressão de Ciclina D1. Esse processo resulta em um incremento do efeito proliferativo nas células epiteliais da bexiga T24 quando estimuladas por nicotina. Portanto, os compostos ativos presentes no extrato de *G. vellosii* podem antagonizar essa via, exibindo um potencial antitumoral significativo.

A utilização da cisplatina como controle positivo nos ensaios de viabilidade e migração celular é uma prática comum devido à sua eficácia amplamente documentada no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o CB. A escolha de uma concentração de 5 μ M para a cisplatina, correspondente aproximadamente à concentração sérica máxima obtida em humanos sob dosagem convencional para

tratamento de CB⁽³⁵⁾, estabelece um padrão relevante para comparação dos efeitos dos extratos testados.

Diante dos resultados obtidos com os extratos, especialmente o extrato de *G. vellosoi*, e sua comparação com a cisplatina, fica evidente a necessidade de aprofundar as investigações. É crucial realizar mais testes envolvendo os compostos isolados desses extratos para possibilitar uma comparação mais precisa e fidedigna com a cisplatina. Esses estudos adicionais devem incluir não apenas análises de curto prazo, como viabilidade e migração celular, mas também investigar os efeitos a longo prazo desses compostos, identificando as vias de morte celular ativadas, mas também entendendo como interagem a nível molecular. Ao elucidar esses mecanismos, será possível confirmar as hipóteses levantadas sobre a atividade antitumoral desses extratos e avaliar seu potencial como alternativas ou complementos aos tratamentos convencionais, como a cisplatina.

3.6 Conclusões

Os extratos de *E. oleracea* Mart. demonstraram ação inibitória sobre a viabilidade celular e a capacidade de formação de colônias da linhagem T24, evidenciando manutenção de efeito mesmo após interrupção da exposição aos extratos. Por outro lado, o extrato de *G. vellosoi* demonstrou potencial citotóxico contra as células dessa linhagem, inibindo a viabilidade e a capacidade de migração em baixas concentrações. Os extratos testados, especialmente o extrato de *G. vellosoi*, apresentaram resultados favoráveis quando comparados à cisplatina, com potencial exequibilidade desses compostos naturais como agentes antitumorais.

Conclui-se que os produtos naturais, em particular os extratos derivados da semente de *E. oleracea* e da casca do caule de *G. vellosoi*, mostraram-se promissores no combate ao câncer de bexiga invasivo. Destaca-se a importância da investigação dos mecanismos de ação desses compostos, o isolamento dos bioativos presentes, bem como a condução de pesquisas *in vivo* que permitam o entendimento mais aprofundado das propriedades farmacológicas e terapêuticas das substâncias.

3.7 Referências

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today> Acesso em: 02 fev. 2024
2. Dancik GM, Owens CR, Iczkowski KA, Theodorescu D. A Cell of Origin Gene Signature Indicates Human Bladder Cancer Has Distinct Cellular Progenitors. *Stem Cells*. 2014 Mar 17;32(4):974–82.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Early detection. Geneva: WHO, 2007. (Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes, module 3). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43743/9241547338_eng.pdf Acesso em: 02 fev. 2024.
4. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Compérat EM, Cowan NC, Gakis G, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European Urology*. 2021 Jan;79(1):82–104.
5. Silva MACN da, Costa JH, Pacheco-Fill T, Ruiz ALTG, Vidal FCB, Borges KRA, et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules*. 2021 Jun 10;26(12):3546.
6. Li JM, Huang YC, Kuo YH, Cheng CC, Kuan FC, Chang SF, et al. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers*. 2019 Jul 22;11(7):1034–4.
7. Pinto VBP. Efeitos dos extratos de *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* em linhagens celulares de câncer cervical. [Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs]; 2023.
8. Lima JA et al. *Geissospermum vellosii* stem bark anticholinesterase activity and

improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 92 (2009) 508–513.

9. Lima JA et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An Acad Bras Cienc* (2016). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140374>.

10. Lima JA et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry* 104 (2020) 104215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>.

11. Lin SR, Fu YS, May Jywan Tsai, Cheng H, Weng CF. Natural Compounds from Herbs that can Potentially Execute as Autophagy Inducers for Cancer Therapy. 2017 Jul 1;18(7):1412–2.

12. Meneses-Gutiérrez CL, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J, Guerrero-Legarreta I, Téllez DI, Jaramillo-Flores ME. Antioxidant Capacity and Cytotoxic Effects of Catechins and Resveratrol Oligomers Produced by Enzymatic Oxidation against T24 Human Urinary Bladder Cancer Cells. *Antioxidants*. 2019 Jul 10;8(7):214.

13. Liu J, Zhang WY, Kong ZH, Ding DG. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by grape seed procyanidin extract in human bladder cancer BIU87 cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Jul;20(15):3282-91.

14. Hsieh DS, Wang H, Tan SW, Huang YH, Tsai CY, Yeh MK, et al. The treatment of bladder cancer in a mouse model by epigallocatechin-3-gallate-gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(30):7633–40.

15. Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang YB, Bai Y, Shen HF, et al. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007 Mar;354(4):852–7.

16. Kemberling JA, Hampton JA, Keck RW, Gomez MA, Selman SH. Inhibition of Bladder Tumor Growth by the Green Tea Derivative Epigallocatechin-3-Gallate. 2003 Sep 1;170(3):773–6.
17. Luo KW, Lung WY, Chun-Xie, Luo XL, Huang WR. EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/AKT pathway. *Oncotarget*. 2018 Jan 16;9(15):12261–72.
18. Martinez R, Guimarães D, Berniz C, Abreu J, Rocha A, Moura R, et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. *Foods*. 2018 Oct 26;7(11):178.
19. Barros L, Calhella RC, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, Santos EA, Regis WCB, Ferreira ICFR. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Ind. Crops Prod*. 2015, 76, 318–322.
20. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Noeme Sousa Rocha, Luis Fernando Barbisan. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by açai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. 2012 Sep 1;
21. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2013 Aug;58:68–76.
22. Choi YJ, Choi YJ, Kim NK, Nam RH, Lee S, Lee HS et al. Açai Berries Inhibit Colon Tumorigenesis in Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mice. *Gut Liver* 2017, 11, 243–252.
23. Graziano V, De Laurenzi V. Role of p63 in cancer development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2011 Aug;1816(1):57–66.
24. Qiu X, Mei J, Yin J, Wang H, Wang J, Xie M. Correlation analysis between

expression of PCNA, Ki-67 and COX-2 and X-ray features in mammography in breast cancer. *Oncology Letters*. 2017 Jul 4;14(3):2912–8.

25. Beljanski M, Crochet S, Beljanski M. PB-100: a potent and selective inhibitor of human BCNU resistant glioblastoma cell multiplication. *Anticancer Res*. 1993,13: 2301-2308.

26. Dong R, Chen P, Chen Q. Extract of the Medicinal Plant Pao Pereira Inhibits Pancreatic Cancer Stem-Like Cell In Vitro and In Vivo. *Integrative Cancer Therapies* 17(4) 2018. <https://doi.org/10.1177/153473541878602>.

27. Chen P, Dong R, Chen Q. Extracts of the Medicinal Plants Pao Pereira and Rauwolfia vomitoria Inhibit Ovarian Cancer Stem Cells In Vitro. *Integrative Cancer Therapies*, 2022, Vol 21: 1–9. DOI: 10.1177/153473542211230.

28. Beljanski M, Beljanski MS. Three alkaloids as selective destroyers of cancer cells in mice. Synergy with classic anticancer drugs. *Oncology*. 1986;43:198-203.

29. Kim S, Lee TJ, Jaechan Leem, Kyeong Sook Choi, Park JW, Taeg Kyu Kwon. Sanguinarine-induced apoptosis: Generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008 Jan 11;104(3):895–907.

30. Tsukamoto H, Kondo S, Yoshiki Mukudai, Tatsuhito Nagumo, Yasuda A, Kurihara Y, et al. Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. *PubMed*. 2011 Sep 1;31(9):2841–6.

31. Slaninová I, Kateřina Pěňčíková, Urbanová J, Slanina J, Táborská E. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. 2013 Apr 13;13(1):51–68.

32. Ross JL. The impacts of molecular motor traffic jams. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Apr 9;109(16):5911–2.

33. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737-45. Erratum in: *JAMA*. 2011 Nov 23;306(20):2220.
34. Chen RJ, Ho YS, Guo HR, Wang YJ. Long-term Nicotine Exposure–Induced Chemoresistance Is Mediated by Activation of Stat3 and Downregulation of ERK1/2 via nAChR and Beta-Adrenoceptors in Human Bladder Cancer Cells. *Toxicological Sciences*. 2010 Jan 27;115(1):118–30.
35. Galsky MD, Guan X, Deepali Rishipathak, Rapaport AS, Shehata HM, Romain Banchereau, et al. Immunomodulatory effects and improved outcomes with cisplatin-versus carboplatin-based chemotherapy plus atezolizumab in urothelial cancer. *Cell Reports Medicine*. 2024 Jan 1;101393–3.

4 CAPÍTULO 2: “The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review”

4.1 Abstract

Objective: MicroRNAs are small non-coding expressed abundantly in a variety of biofluids, making them promising candidates in the discovery of cancer biomarkers. This review aims to present the main current evidence about the use of miRNA as biomarkers in the non-invasive diagnosis of bladder cancer. **Methods:** A systematic review of the literature was performed in July, 2022 in Medline database, according to PRISMA guidelines. The initial search retrieved a total of 437 studies; of these 21 were included in the final analyses. All articles included satisfactorily met the requirements of the risk of bias assessment using the Joanna Briggs Institute Critical Assessment Tools. The data was gathered based miRNA expressed, samples type, profile of expression and accuracy. **Results:** 21 original articles were selected for this systematic review. Most of the studies of miRNA expression in human fluids use urine as source of material for analyses. **Conclusion:** There is a trend to cluster the miRNA expressed to build diagnostic panels or use them in association with other diagnostic methods, with reasonable accuracy.

Prospero database registration: (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>) under ID CRD42022351686.

Keywords: Urinary bladder neoplasms; Biomarkers; Early detection of cancer

4.2 Introduction

Bladder cancer (BCa) is the ninth most common cause of death related to tumors, affecting approximately 3,4 million of people in the world.⁽¹⁾ Early detection of BCa is essential for improvement of the patient's prognosis and survival rates.⁽²⁾ However, the methods used in the clinical practice are often unsatisfactory, once they are inaccurate or highly invasive.⁽³⁾

There is a limited number of standardized non-invasive markers for the diagnosis of BCa that can overcome invasive procedures such as cystoscopy. Voided urine cytology (VUC) is the primary method for detecting BCa in urine; although it has

high specificity, it has reduced sensitivity, especially in low-grade tumors.⁽⁴⁾ Therefore, alternative biomarkers are being researched in order to overcome this disadvantage.⁽⁵⁾

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that have been conserved throughout evolution and are able to regulate gene expression.⁽⁶⁾ Depending on the context and cell type in which they are expressed, the same miRNA may exhibit oncogenic or tumor suppressor activity.⁽⁷⁾ Circulating miRNAs are abundantly present in a variety of biofluids, including blood and urine, making them promising candidates in the discovery of cancer biomarkers.⁽⁸⁾

MiRNA profiles have been associated to several types of tumors, including bladder cancer.⁽⁴⁾ This review aims to present the main current evidences about the use of miRNA as biomarkers in the non-invasive diagnosis of bladder cancer.

4.3 Methods

4.3.1 Protocol and registration

This systematic review was reported in accordance with PRISMA guidelines.⁽⁹⁾

4.3.2 Data source and search strategy

The search was carried out by two independent reviewers, using the same search strategy, in the MEDLINE database, including papers of the last five years and with no restriction of language of the publications. Database was searched at July, 2022. In the literature search, each of the terms for exposure was combined with the outcome term, using the Booleans terms, according to described: (((urothelial cancer) OR (bladder cancer)) AND ((microRNA) OR (miRNA)) AND ((screening) OR (diagnostic))).

4.3.3 Eligibility criteria

It was included observational studies that compared of the expression of miRNA in patients with BCa or urothelial upper tract urinary cancer and controls without this cancer. Besides that, those studies should assess the use of this biomarker as a

potential tool in the non-invasive diagnosis of the disease.

For study eligibility, the patient population, intervention, comparator, outcome, and study design (PICOS) approach were used. It was considered a relevant study if it met the following criteria: patients diagnosed with bladder cancer or urothelial cancer (P); miRNA as a potential biomarker for non-invasive diagnosis of BCa or to improve other non-invasive tools for diagnosis of this neoplasia were included (I) compared to controls (C) and compared the effectivity of the biomarker (O). Review articles, opinion articles, editorials, commentaries, case reports and studies conducted exclusively with animals or cell lines in vitro and meeting abstracts were excluded from the review (S).

4.3.4 Selection of studies

Titles and abstracts were perused to exclude those studies that were obviously irrelevant for the review. The full texts of the remaining studies were retrieved and those studies that were eligible for this systematic review were identified. The selection of the studies was carried out for two reviewers independently, considering eligibility criteria. Disagreements were resolved by a third reviewer.

4.3.5 Data extraction

Using a standardized protocol (can be accessed in the PROSPERO website), two reviewers extracted the data from the included studies. Of each study we extracted the following information: authorship and publication year, place of the study (city, state, country), data collection period, study design, setting (hospital, population), sample size, source of the miRNA detected (blood, urine, tissue), main results of the study. In order to facilitate tabulation and better visualization of study data, Microsoft Office Excel version 17.0 software was used.

4.3.6 Assessment of risk of bias

Methodological quality (risk of bias) of the studies was assessed by two independent reviewers using the Joanna Briggs Institute (JBI) Critical Assessment Tools. This methodology was chosen because it presents specific check-lists for

several studies types, including case controls, in assessing the trustworthiness, relevance and results of published papers.⁽¹⁰⁾

4.4 Results

4.4.1 Quality of studies and measure of evidence

A total of 437 papers were retrieved by searching MEDLINE (July, 2022). Of these, 21 original articles were selected for this systematic review (Figure 1). 386 papers were excluded after reading the titles and abstracts as they did not meet the inclusion criteria. 28 papers were excluded after complete reading. During the risk of bias analysis of 23 papers, 2 were excluded as they presented a high risk of bias. All articles included satisfactorily met the requirements of the risk of bias assessment (Figure 2). Ten papers were related to detection of miRNA in the urine, nine studies searched the biomarker in the blood and two in both fluids (Table 1).

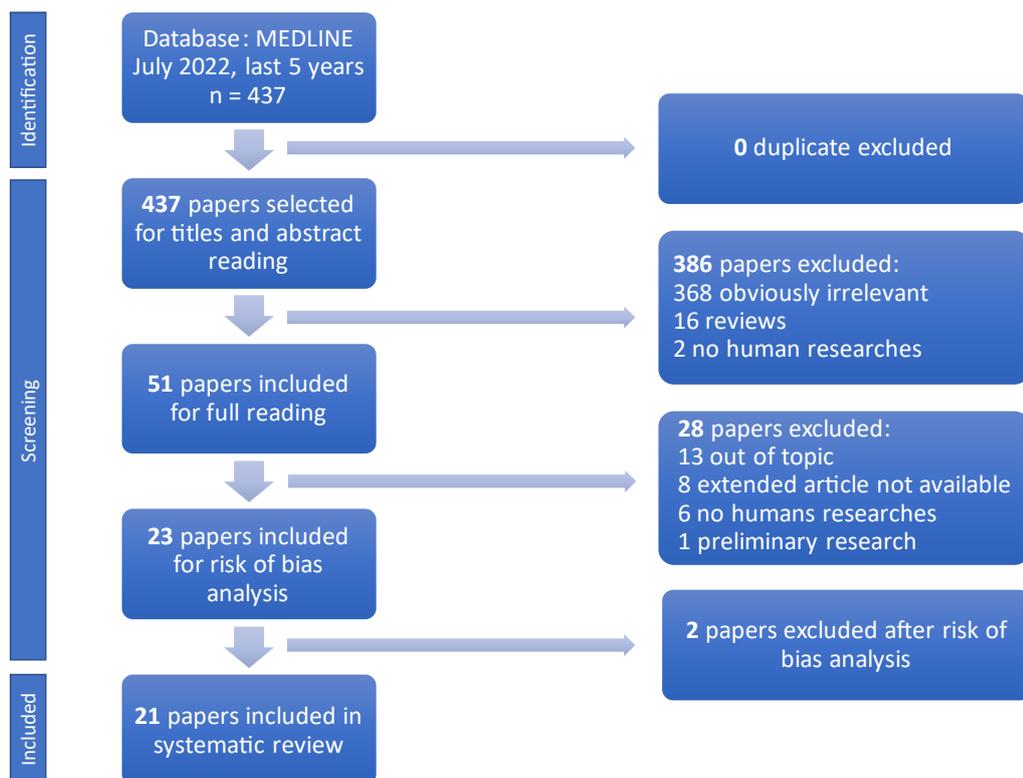


Figure 1: Process of selecting papers for systematic review

Author, year (reference)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wang, 2020 (2)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Erdmann, 2020 (4)	Y	Y	Y	Y	Y	UN	UN	Y	N/A	Y
Singh, 2022 (6)	Y	Y	Y	Y	Y	UN	UN	Y	N/A	Y
Lin, 2021 (8)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N/A	Y
Li, 2021 (11)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Lin, 2021 (14)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Tölle, 2019 (19)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Chen, 2019 (20)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	UN	Y	N/A	Y
Geva, 2017 (21)	Y	Y	Y	Y	Y	UN	UN	Y	N/A	Y
Li, 2022 (22)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	UN	Y	N/A	Y
Juracek, 2018 (23)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Piao, 2019 (24)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Hofbauer, 2018 (25)	Y	Y	Y	Y	Y	UN	UN	Y	N/A	Y
Usuba, 2019 (26)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Chen, 2019 (28)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Yang, 2021 (29)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
El-Shal, 2021 (30)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Jiang, 2020 (32)	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	N/A	Y
Ghorbanmehr, 2019 (33)	Y	Y	Y	Y	Y	UN	UN	Y	N/A	Y
Wang, 2019 (34)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y
Wang, 2019 (35)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N/A	Y

Y: yes; N: no; UN: unclear; N/A: not applicable.

Figure 2: Quality assessment of included articles using JBI checklist for case control studies

As the studies were searching for diagnostics tools, most of them used the area under the receiver operating characteristic curve (AUC). This is the most commonly used performance measure to indicate the discriminative ability of a prediction mode, and an AUC value higher than 0.6 could be a potential marker and higher than 0.7 is strong enough to differentiate two groups.^(11,12) The measures of sensitivity and specificity provide the probability that the test distinguish correctly the sick people and the health one, respectively.⁽¹³⁾

Table 1: Characteristics of studies involving microRNAs in the non-invasive diagnostic of bladder cancer

					[miR-6087, miR-1343-5p]	[Down, Down]	0.90	97%	74%
					[miR-6087, miR-6724-5p, miR-3960, miR-1343-5p, miR-1185-1-3p, miR-6831-5p, miR-4695-5p]	[Down, Up, Down, Down, Up, Up, NA]	0.97	95%	87%
Jiang (32)	2020	118	120	Urine	miRNA-192 [miRNA-192, BUS]	Down	0.79 0.95	76.7% 93.2%	78% 76.7%
El-Shal (30)	2021	51	45 (21+24)	Urine	miR-96-5p miR-183-5p [miR-96-5p, miR-183-5p]	Up Up	0.85 0.83 0.88	80.4% 78.4% 88.2%	91.8% 81.6% 87.8%
Lin (8)	2021	80	100	Urine	let-7b-5p miR-149-5p miR-146a-5p miR-423-5p	Up Up Up Up			
Ghorbanmehr (33)	2019	45	42	Urine	miR-21-5p miR-141-3p miR-205-5p	Up Up Up	0.76 0.74 0.73	84% 71% 82%	59% 71% 62%
Wang (34)	2019	50	40	Blood	miR-492	Up	0.86		
Wang (35)	2019	55	45	Blood	miRNA-373	Up	0.84		
Yang (29)	2021	208 (88+120)	36	Blood	miR-10a-5p	Up	0.78	75%	64.2%
Lin (14)	2021	63 (12+51)	55 (4+51)	Urine	miR-93-5p miR-516a-5p	Up Up	0.83 0.79	74.1% 72.9%	90.2% 89.9%
Piao (24)	2019	326	217 (174+43)	Urine	[miR-6124, miR-4511]	[Up, Down]	0.81	78.5%	70.9%
Hofbauer (25)	2018	115	87	Urine	[let-7c, miR-148a, miR-204, miR-135a, miR-135b, miR-345]	[Down, Down, Down, Up, Up, Up]	0.88		

AUC: area under curve; NA: no altered; BUS: bladder ultrasound.

4.5 Discussion

4.5.1 Detection of miRNA in human fluids

The detection of miRNA in human fluids is a promising diagnostic and prognostic tool, due to their tissue and tumor specific expression. Increased and decreased expression of such miRNA are related to specific patterns of malignant or normal cells of the bladder and other organs.⁽⁴⁾ miRNAs can be packed and released through exosomes or extracellular vesicles, enhancing their stability in biofluids such as urine and plasma.⁽¹¹⁾ These small vesicles of the cell membrane have a stable structure against degradation by enzymes, and the miRNA inside them can be used to discover characteristics of the tissue of origin.⁽¹⁴⁾

The urothelium is an extensive and highly specialized tissue that overlay all the urinary tract. Therefore, it is in close contact with the urine. Consequently, it is natural

to think about using this fluid for the analyses of the genetic material of urothelial cells; it has an additional advantage of easy collect. Besides that, urine tends to have less dilute biomarkers than serum, due to the greater volume and natural barriers of the blood.⁽¹⁵⁾ Thereby, most of the studies of miRNA expression in bladder cancer use this fluid as source of material for analyses.

It is worth emphasizing the particular challenge in differentiating interstitial cystitis from bladder cancer through cystoscopy, as both conditions produce very similar macroscopic urothelial changes.⁽¹⁶⁾ Also in this condition, it is possible to make use of genetic and epigenetic tools whose material source is urine, for example, miRNAs, such as miR-373-5p, miR-6766-5p, among others, or even urinary protein expression for diagnosis differential.^(17,18)

On the other hand, some authors report a better performance of blood as a source of material, stating that this fluid would have fewer pre-analytical and analytical problems than urinary samples. The miRNA in plasma and serum samples have higher stability and cell-free plasma could be prepared in a simpler centrifugation, with two steps.⁽¹⁹⁾ In the study of Chen⁽²⁰⁾ it was observed a significant association between the expression of one single miRNA (miR-101) in the serum of the patients and the stage of the tumor, pathological grade and lymph node metastasis, but not with age, gender, tumor size or tumor stage.

4.5.2 Panel multi-miRNA

In addition, proposing that one single miRNA could be used to distinguish patients with bladder cancer from health people, Wang et al.⁽²⁾ defend that a combination of several miRNAs might provide higher accuracy than miRNAs individually. Therefore, they built a diagnostic panel combining the expression data of miR-130a-3p, miR-130b-3p and miR-301a-3p (AUC: 0.961; sensitivity = 87.8%, specificity = 93.3%). Furthermore, they verified that the levels of miR-130a-3p and miR-301a-3p were significantly correlated with tumor stage. Despite that, expression levels of miR-130b-3p and miR-301b-5p had no relationship with tumor stage.

Geva et al.⁽²¹⁾ also proposed a diagnostic score by summing standardized levels of overexpressed miRNA in the urine. This panel was considerably higher in tract urinary cancer patients compared to healthy controls, having good discrimination ability

(AUC: 0.89). A diagnostic panel of miRNA based on logistic regression model composed of miR-132-3p, miR-7-5p, and miR-148b-3p from blood showed potential to improve the accuracy in diagnosis of the BCa (AUC: 0.92; sensitivity = 90.24%, specificity =81.71%). Additionally, it was found miR-132-3p and miR-148b-3p were related to the prognosis of BCa patients.⁽²²⁾

The study of Juracek et al.⁽²³⁾ found 76 miRNAs differentially expressed in the urine of patients with BCa and health people. The authors associated the two more elevated urinary miRNA to compose a score. This association enabled the distinction of patients and controls (sensitivity of 82%, specificity of 70%, AUC 0.84), less advanced tumors (without invasion of muscular layer) and more advanced tumors (with invasion of muscular layer) and the grade of tumor differentiation (low grade or high grade).

In the context of patients who presented hematuria – a common symptom in the diagnosis of bladder tumors, Piao et al.⁽²⁴⁾ proposed an application of miRNA to differentiate benign hematuria to that related to cancer. In this multicentric trial, it was evaluated urinary samples of patients with BCa compared to samples from patients of non-oncologic entities (prostate benign hyperplasia, stress urinary incontinence, urolithiasis and urinary tract infection). 284 patients with BCa were distinguished from 206 patients with hematuria or pyuria, based on the ratio of urinary miR-6124 to miR-4511 (sensitivity 78.5%; specificity 70.9%; AUC: 0.81). In patients with gross hematuria the sensitivity was improved to 94%. Hofbauer et al.⁽²⁵⁾ also conducted a study that analyzed the expression of miRNAs in urine of patients with BCa and in patients with microscopic hematuria as a control group and composed a panel of six urinary miRNAs capable of distinguishing patients with BCa (AUC: 0.88).

In the study conducted by Usuba et al.,⁽²⁶⁾ seven candidates' miRNAs for BCa screening were identified. The combination of these miRNAs demonstrated high diagnostic precision for this cancer (AUC: 0.97; Sensitivity: 95%; Specificity 87%). Moreover, among the studies analyzed, it was the only one to investigate the performance of miRNAs to differentiate BCa from other types of cancer. For this, it analyzed miR-6087 alone, 2 miRNAs (miR-6087 and miR-1343-5p) and proposed a panel of 7 miRNAs. It was verified high sensitivity (miR-6087: 94.4%; 2-miRNA: 94.9%; 7-miRNA: 95.4%) and high specificity (84.5%) to discriminate BCa from twelve solid tumors. Although there was no clear distinction from gastric adenocarcinoma and

biliary tract cancer, the 7-miRNA panel demonstrated 100% specificity to differentiate sarcoma, pancreatic cancer and breast cancer by analysis of the 7-miRNA panel.

4.5.3 The use of miRNA as a diagnostic tool in patients with chronic kidney disease

The diagnosis of bladder cancer in patients with chronic kidney disease is particularly challenging, so it has often reached a late stage. Some of these patients are anuric, therefore, VUC is not viable. Most of them cannot accomplish contrasted exams, such as urothomography.⁽²⁷⁾ Due to these particular difficulties, some reports have focused in the study of expression of microRNAs in these patients.

Chen et al.⁽²⁸⁾ specifically evaluated serum expression of miRNAs in the diagnosis of bladder cancer in patients with chronic kidney disease. miR-19b-1-5b showed prognostic value: patients with low levels of this miRNA had significantly shorter overall survival than those with high expression levels. The authors observed that five expression ratios of two miRNAs (miR-155-5p/miR-150-5p; miR-378a-3p/miR-150-5p; miR-636/miR-150-5p; miR-150-5p/miR-210-3p and miR-19b-1/miR-378a-3p) were significantly different between patients with cancer and controls. After that they combined four of these ratios in a panel multi-miRNA and found an AUC of 0.882.

Li et al.⁽¹¹⁾ investigated the expression levels of miRNA in the urine and plasma of patients with chronic kidney disease in Taiwan and could establish relationship between the expression of miRNA and poor prognosis in urinary cancer. They also proposed a nomogram in order to validate the incidence of urothelial cancer (AUC: 0.73).

4.5.4 Relationship between expression of miRNA and surgical ablation of the tumor

Tölle et al.⁽¹⁹⁾ were the first to obtain plasma samples from the same patient at different stages of disease for surveillance monitoring. In this study, using a logistic regression model to combine miR-15b-5p and miR-590-5p, there was not further improvement of the discrimination ability achieved for them individually. A change in those miRNA level was not observed a few days after surgery for ablation of the tumor,

what, for the authors, suggest them as potential biomarkers.

Paradoxically, Yang et al.⁽²⁹⁾ found different results to that. It was collected plasma samples from patients before and 1 month after surgery for resection of bladder tumor, in order to analyze the regulation of miR-10a-5p compared to a health group (AUC: 0,81; sensitivity 79,5%; specificity 65,6%). The results showed that the plasma levels of miR-10a-5p were significantly lower 1 month after surgery compared to the initial values. Similar methodology was employed in the study performed for El-Shal et al.⁽³⁰⁾ Four weeks after surgery, it was collected urine samples that confirmed significant reduction in the expression of miR-96-5p and miR-183-5p.

4.5.5 The use of miRNA associated other diagnostic methods

There is no doubt that in non-muscle invasive bladder cancer detection methods are not very specific, so the use of new tools may represent an additional resource for diagnosing BCa in earlier stages of the disease.⁽³¹⁾

Erdmann et al.⁽⁴⁾ compared the accuracy of nine miRNAs and that of VUC, one of the classic methods for diagnosing BCa. None of these single miRNAs could surpass the performance of single VUC (sensitivity: 76.9%; specificity: 100%; accuracy of 84.0%). When the VUC and 4 miRNAs (miR-125b, -145, -183, and -221) were used in association, there was an increase in diagnostic power (sensitivity 84.6%; specificity 95.7% and accuracy 88%), seemed to have a promising potential for reliable diagnosis of BCa in urine samples. It should be noted, however, that most patients with bladder cancer in this study had high-grade tumors (83.7%), which may have increased the accuracy of the VUC.

The expression of urinary miRNA was also compared to VUC in the multicentric study of Piao et al.⁽²⁴⁾ In their study, it was found a VUC sensitivity of only 7.8% in low-grade tumors, reaching up to 25% in patients with high-grade neoplasia. The sensitivity of the urinary biomarker studied by him was significantly higher than that of the VUC and he was able to detect BCa to any grade with sensitivity >70%.

Another successful association of miRNA with traditional diagnostic methods in the BCa approach was made by Jiang et al.⁽³²⁾ In his study, it was showed that miR-192 expression was significantly reduced in the urine of patients with BCa. This alteration was related to the stage and size of the tumor: the more advanced and larger,

the less expressed was the miRNA. There was a significant increase in sensitivity (93.2%) and specificity (76.7%) of this biomarker when combined with ultrasound. The association of these two non-invasive methods had no significant difference in sensitivity when compared to cystoscopy, an invasive examination and the gold standard for the diagnosis of bladder cancer. It may therefore represent a promising substitute for the method, after validation by clinical studies.

4.5.6 Limitations of the study

A systematic review offers highly relevant evidence, according to the hierarchical pyramid of evidence classification. Although only one database was searched, thorough research was carried out, with studies being subjected to quality assessment following the criteria of a widely recognized assessment checklist. However, the usefulness of our study may be partially limited by no meta-analysis of the data presented. Despite this, the results presented are current and relevant for future research.

4.6 Conclusions

Recent evidences have shown miRNAs as promising non-invasive bladder cancer biomarkers. Its combined use to compose diagnostic panels proved to be a relevant strategy in the accurate detection of the disease. The association of miRNAs with other non-invasive diagnostic methods can improve their accuracy and allow a reduction in the use of invasive methods, contributing to a timely diagnosis.

4.7 References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Wang J, Zhao L, Peng X, Liu K, Zhang C, Chen X, et al. Evaluation of miR-130 family members as circulating biomarkers for the diagnosis of bladder cancer. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(12):e23517.

3. Almallah YZ, Rennie CD, Stone J, Lancashire MJ. Urinary tract infection and patient satisfaction after flexible cystoscopy and urodynamic evaluation. *Urology*. 2000;56(1):37–9.
4. Erdmann K, Salomo K, Klimova A, Heberling U, Lohse-Fischer A, Fuehrer R, et al. Urinary MicroRNAs as Potential Markers for Non-Invasive Diagnosis of Bladder Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3814.
5. Ahn JH, Kang CK, Kim EM, Kim AR, Kim A. Proteomics for Early Detection of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Clinically Useful Urine Protein Biomarkers. *Life (Basel)*. 2022;12(3):395.
6. Singh P, Singh A, Gupta N, Raja KD, Singh P, Agarwal S, et al. Non-invasive diagnostic potential of microRNA-203 in liquid biopsy of urothelial carcinoma of bladder. *Mol Cell Biochem*. 2022;477(9):2173–82.
7. Plawgo K, Raczynska KD. Context-Dependent Regulation of Gene Expression by Non-Canonical Small RNAs. *Noncoding RNA*. 2022;8(3):29.
8. Lin JT, Tsai KW. Circulating miRNAs Act as Diagnostic Biomarkers for Bladder Cancer in Urine. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4278.
9. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372(71):n71.
10. Aromataris E, Fernandez R, Godfrey CM, Holly C, Khalil H, Tungpunkom P. Summarizing systematic reviews: methodological development, conduct and reporting of an umbrella review approach. *Int J Evid-Based Healthc*. 2015;13(3):132–40.
11. Li AL, Chou CY, Chen CL, Wu KL, Lin SC, Chen HC, et al. The MicroRNA Prediction Models as Ancillary Diagnosis Biomarkers for Urothelial Carcinoma in Patients With

Chronic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:726214.

12. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics*. 2013;9(2):280–99.

13. Bassanezi RC. Um software para modelagem matemática de fenômenos biológicos. *Biomatemática* 14. Campinas: IMECC; 2004. pp. 55–8.

14. Lin H, Shi X, Li H, Hui J, Liu R, Chen Z, et al. Urinary Exosomal miRNAs as biomarkers of bladder Cancer and experimental verification of mechanism of miR-93-5p in bladder Cancer. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1293.

15. Kutwin P, Borkowska EM, Bogucka P, Jabłonowski Z. Expression profile of microRNAs (106b-3p, 130b-3, 145-3p, 199a-5p) in urine and serum samples from patients with the diagnosis of bladder cancer. *Pol Merkuriusz Lek*. 2021;49(290):103–7.

16. DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder Cancer: diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2017;96(8):507–14.

17. Urabe F, Furuta A, Igarashi T, Suzuki Y, Egawa S, Kimura T. Urinary extracellular vesicle microRNA profiling for detection in patients with interstitial cystitis. *Transl Androl Urol*. 2022;11(7):1063–6.

18. Goo YA, Tsai YS, Liu AY, Goodlett DR, Yang CC. Urinary proteomics evaluation in interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a pilot study. *Int Braz J Urol*. 2010;36(4):464–78.

19. Tölle A, Buckendahl L, Jung K. Plasma miR 15b 5p and miR 590 5p for distinguishing patients with bladder cancer from healthy individuals. *Oncol Rep*. 2019;42(4):1609–20.

20. Chen X. MiR-101 acts as a novel bio-marker in the diagnosis of bladder carcinoma.

Medicine (Baltimore). 2019;98(26):e16051.

21. Geva GA, Gielchinsky I, Aviv N, Max KE, Gofrit ON, Gur-Wahnon D, et al. Urine cell-free microRNA as biomarkers for transitional cell carcinoma. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):641.

22. Li R, Xia Y, Chen X, Li X, Huang G, Peng X, et al. Identification of a three-miRNA panel in serum for bladder cancer diagnosis by a diagnostic test. *Transl Cancer Res*. 2022;11(5):1005–16.

23. Juracek J, Peltanova B, Dolezel J, Fedorko M, Pacik D, Radova L, et al. Genome-wide identification of urinary cell-free microRNAs for non-invasive detection of bladder cancer. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):2033–8.

24. Piao XM, Jeong P, Kim YH, Byun YJ, Xu Y, Kang HW, et al. Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria. *Int J Cancer*. 2019;144(2):380–8.

25. Hofbauer SL, de Martino M, Lucca I, Haitel A, Susani M, Shariat SF, et al. A urinary microRNA (miR) signature for diagnosis of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2018;36(12):531.e1–8.

26. Usuba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, et al. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(1):408–19.

27. Sanli O, Dobruch J, Knowles MA, Burger M, Alezaffar M, Nielsen ME, et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3(1):17022.

28. Chen CL, Lin CH, Li AL, Huang CC, Shen BY, Chiang YR, et al. Plasma miRNA profile is a biomarker associated with urothelial carcinoma in chronic hemodialysis patients. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;316(6):F1094–102.

29. Yang L, Sun HF, Guo LQ, Cao HB. MiR-10a-5p: A Promising Biomarker for Early Diagnosis and Prognosis Evaluation of Bladder Cancer. *Cancer Manag Res.* 2021;13:7841–50.
30. El-Shal AS, Shalaby SM, Abouhashem SE, Elbary EH, Azazy S, Rashad NM, et al. Urinary exosomal microRNA-96-5p and microRNA-183-5p expression as potential biomarkers of bladder cancer. *Mol Biol Rep.* 2021;48(5):4361–71.
31. Babjuk M, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Dominguez Escrig JL, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). *Eur Urol.* 2022;81(1):75-94. Review.
32. Jiang F, Li C, Han J, Wang L. Diagnostic Value of Combination of MicroRNA-192 in Urinary Sediment and B-Ultrasound for Bladder Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19:1533033819894573.
33. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaei M, Einollahi B, Mowla SJ. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine-promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate.* 2019;79(1):88–95.
34. Wang K, Lü H, Qu H, Xie Q, Sun T, Gan O, et al. miR-492 Promotes Cancer Progression by Targeting GJB4 and Is a Novel Biomarker for Bladder Cancer. *OncoTargets Ther.* 2019;12:11453–64.
35. Wang Y, Xu Z, Wang X. miRNA-373 promotes urinary bladder cancer cell proliferation, migration and invasion through upregulating epidermal growth factor receptor. *Exp Ther Med.* 2019;17(2):1190–5.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos derivados da semente de *E. oleracea* e da casca do caule de *G. vellosii* mostraram-se promissores no combate ao câncer de bexiga invasivo.

Os resultados indicam que a composição química de EOSL e EOJ, rica em catequinas, procianidinas e EGCG, desempenha atividade citotóxica contra células de câncer de bexiga. A eficácia observada em inibir a proliferação celular e a capacidade de formação de colônias na linhagem de câncer de bexiga, bem como de induzir a apoptose em outras linhagens, posiciona estas substâncias como candidatas viáveis para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas menos tóxicas e mais seletivas. Para isso, destaca-se a importância de uma investigação mais aprofundada sobre os mecanismos de ação desses compostos.

Por outro lado, o extrato de *G. vellosii*, rico em alcaloides indólicos, demonstrou maior potencial citotóxico contra as células T24, inibindo a viabilidade em baixas concentrações. Além disso, o extrato de *G. vellosii* inibe a migração das células T24 de forma dose-dependente, sugerindo uma ação inibitória sobre a capacidade de migração das células cancerígenas, o que pode estar relacionada à influência na sua interação com microtúbulos, gradientes de proteínas especializadas que facilitam a migração celular.

A observação de que os extratos, especialmente o extrato de *G. vellosii*, apresentam resultados promissores quando comparados à cisplatina destaca a potencial viabilidade desses compostos naturais como agentes antitumorais. Contudo, para validação do potencial desses extratos, é necessário um aprofundamento nas pesquisas. A realização de estudos focados no isolamento dos compostos bioativos presentes nesses extratos permitiria o entendimento mais aprofundado das propriedades farmacológicas e terapêuticas dessas substâncias.

A partir da revisão sistemática, foi proposta a busca por evidências mais recentes sobre o papel de miRNAs como promissores biomarcadores não invasivos de câncer de bexiga. Seu uso combinado para compor painéis diagnósticos mostrou-se uma estratégia relevante na detecção precisa da doença. A associação de miRNAs com outros métodos diagnósticos não invasivos pode melhorar a sua acurácia e permitir a redução do uso de métodos invasivos, contribuindo para um diagnóstico oportuno.

Este estudo enfrentou desafios significativos que impactaram a execução de testes propostos. Dentre eles, condições adversas no cultivo celular, incluindo variações inesperadas no ambiente de cultivo, limitaram a replicabilidade e a consistência dos resultados obtidos. Adicionalmente, limitações financeiras restringiram a aquisição de recursos e equipamentos, influenciando diretamente na amplitude e na profundidade dos testes que poderiam ser desenvolvidos. Esses fatores, embora representem obstáculos significativos, também oferecem direções para futuras pesquisas, enfatizando a importância de estratégias adaptativas no planejamento experimental e na gestão de recursos.

REFERÊNCIAS

AHN, J.-H. et al. Proteomics for Early Detection of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: Clinically Useful Urine Protein Biomarkers. **Life**, v. 12, n. 3, p. 395, 9 mar. 2022.

AWUCHI, C. G. Medicinal Plants: the Medical, Food, and Nutritional Biochemistry and Uses. **International Journal of Advanced Academic Research**, 1 jan. 2019.

BABJUK, M. et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). **European Urology**, p. S0302-2838(21)019783, 9 set. 2021.

BALASUBRAMANIAN, A. et al. Adjuvant therapies for non-muscle-invasive bladder cancer: advances during BCG shortage. **World Journal of Urology**, v. 40, n. 5, p. 1111–1124, 27 jan. 2022.

BARROS, L. et al. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 318–322, 15 dez. 2015.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M. S. Selective Inhibition of in vitro Synthesis of Cancer DNA by Alkaloids of β -Carboline Class. **Pathobiology**, v. 50, n. 2, p. 79–87, 1982.

BELJANSKI, M.; BELJANSKI, M. S. Three Alkaloids as Selective Destroyers of Cancer Cells in Mice. **Oncology**, v. 43, n. 3, p. 198–203, 1986.

BELJANSKI, M.; CROCHET, S.; BELJANSKI, M. S. PB-100: a potent and selective inhibitor of human BCNU resistant glioblastoma cell multiplication. **PubMed**, v. 13, n. 6A, p. 2301–8, 1 nov. 1993.

Bemis DL, Capodice JL, Desai M, et al. (2009). Beta-carboline alkaloid-enriched extract from the amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer

cells. **J Soc Integr Oncol** 7:59–65

BROWN, E. et al. Mechanisms underlying the anti-proliferative effects of berry components in in vitro models of colon cancer. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 200-209, 2012.

CAMARGO, M. R. M. et al. Composição química, etnofarmacologia e atividade biológica de espécies de *Geissospermum Allemão* (Apocynaceae Juss.). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol. 8(2): 73-160, Jul-Dez 2013.

CHANG, S. S. et al. Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. **The Journal of urology**, v. 198, n. 3, p. 552–559, 2017.

COCCIA, A. et al. Extra Virgin Olive Oil Phenols Suppress Migration and Invasion of T24 Human Bladder Cancer Cells Through Modulation of Matrix Metalloproteinase-2. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 6, p. 946–954, 11 jun. 2014.

CORNELISSEN, S. W. E. et al. Diagnostic Accuracy of Multiparametric MRI for Local Staging of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Urology**, jul. 2020.

CUMMINGS, K. B.; BARONE, J. G.; WARD, W. S. DIAGNOSIS AND STAGING OF BLADDER CANCER. **Urologic Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 455–465, ago. 1992.

DAI, X.; GAKIDOU, E.; LOPEZ, A. D. Evolution of the global smoking epidemic over the past half century: strengthening the evidence base for policy action. **Tobacco Control**, v. 31, n. 2, p. 129–137, 1 mar. 2022.

DANCIK, G. M. et al. A Cell of Origin Gene Signature Indicates Human Bladder Cancer Has Distinct Cellular Progenitors. **Stem Cells**, v. 32, n. 4, p. 974–982, 17 mar. 2014.

DE ALMEIDA MAGALHÃES, Thalita Sévia Soares et al. The Use of Euterpe oleracea Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 813, 2020.

EASTMAN, A. **Pharmacol. Ther.**, 34, 155–166. 1987.

EL-KHATEEB, M. et al. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 77, n. 1-2, p. 13–21, 1 out. 1999.

ERDMANN, K. et al. Urinary MicroRNAs as Potential Markers for Non-Invasive Diagnosis of Bladder Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3814–3814, 27 maio 2020.

FERLAY, J. ET AL. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today> Acesso em: 02 fev. 2024

FREEDMAN, N. D. et al. Incorrect Number in: Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. **JAMA**, v. 306, n. 20, p. 2220, 23 nov. 2011.

FRIDLENDER, M.; KAPULNIK, Y.; KOLTAL, H. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 1 out. 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–83, 2012.

GALSKY, M. D. et al. A consensus definition of patients with metastatic urothelial carcinoma who are unfit for cisplatin-based chemotherapy. **Lancet Oncology**, v. 12, n. 3, p. 211–214, 1 mar. 2011.

HWANG, D. et al. Natural Products and Acute Myeloid Leukemia: A Review

Highlighting Mechanisms of Action. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1010, 3 maio 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. : il.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Detecção precoce do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/deteccao-precoce-do-cancer> Acesso em: 02 fev. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário, Florestal e Aquícola 2017. Disponível em: < <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>> Acesso em: 20 dez. 2023.

JONES, D. L. **Palms Throughout the World**. [s.l.] Reed New Holland, 2000.

KHADHOURI, S. et al. The IDENTIFY study: the investigation and detection of urological neoplasia in patients referred with suspected urinary tract cancer – a multicentre observational study. **BJU International**, v. 128, n. 4, p. 440–450, 8 set. 2021.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **PubMed**, 1 mar. 2009.

KLAUNIG, James E.; KAMENDULIS, Lisa M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KURTOVA, A. V. et al. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. **Nature**, v. 517, n. 7533, p. 209–213, 3 dez. 2014.

LEE, S.-T. et al. Suppression of urinary bladder urothelial carcinoma cell by the ethanol extract of pomegranate fruit through cell cycle arrest and apoptosis. **BMC**

Complementary and Alternative Medicine, v. 13, n. 1, 1 dez. 2013.

LI, J.-M. et al. Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1034–1034, 22 jul. 2019.

LIMA, J. A. et al. Geissospermum vellosii stem bark: Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 508–513, 1 maio 2009.

LIMA, J. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a Geissospermum vellosii stem bark fraction. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 1, p. 237–248, 2 fev. 2016.

LIMA, J. A. et al. Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104215, 2020

LIN, J.-T.; TSAI, K.-W. Circulating miRNAs Act as Diagnostic Biomarkers for Bladder Cancer in Urine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4278, 20 abr. 2021.

LOU, G.-G.; YAO, H.-P.; XIE, L.-P. Brucea javanica Oil Induces Apoptosis in T24 Bladder Cancer Cells via Upregulation of Caspase-3, Caspase-9, and Inhibition of NF- κ B and COX-2 Expressions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 38, n. 03, p. 613–624, jan. 2010.

LUO, M.-L. et al. Advances in indole-containing alkaloids as potential anticancer agents by regulating autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 149, p. 112827, 2022.

MARTINEZ, Raquel Martins et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. **Foods**, v. 7, n. 11, p. 178, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 8 fev. 2012.

PARTIN, A. W. et al. Campbell-Walsh-Wein Urology Twelfth Edition Review. **(No title)**, 2020.

PERINI, J. A. et al. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of Euterpe oleracea extract (açai): A systematic review. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200101, 2 jul. 2018.

PIAZZA, G. A. et al. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. **PubMed**, v. 61, n. 10, p. 3961–8, 15 maio 2001.

PINTO, Ana L.; LIPPARD, Stephen J. Ligação do medicamento antitumoral cis-diaminodichloroplatina (II)(cisplatina) ao DNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer** , v. 3, pág. 167-180, 1985.

PLAWGO, K.; RACZYNSKA, K. D. Context-Dependent Regulation of Gene Expression by Non-Canonical Small RNAs. **Non-Coding RNA**, v. 8, n. 3, p. 29, 29 abr. 2022.

PUISEUX, F. et al. [On the alkaloids of “pao-pereira”, Geissospermum laeve (Vellozo) Baillon. Note III. Geissoschizoline, apogeissoschizine and geissospermine].. **PubMed**, v. 17, p. 626–33, 1 out. 1959.

RAMIREZ, D. et al. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. **BJU International**, v. 117, n. 5, p. 783–786, 29 out. 2015.

RICHTERS, A.; ABEN, K. K. H.; KIEMENEY, L. A. L. M. The global burden of urinary bladder cancer: an update. **World Journal of Urology**, v. 38, 1 nov. 2019.

RODRIGUES, R. B. et al. Capacidade total de eliminação de oxidantes de Euterpe oleracea Mart. sementes de (açai) e identificação de seus compostos polifenólicos. **J. Agric. Química Alimentar**. 2006 , 54 , 4162–4167.

SAFIRI, S.; KOLAH, A.-A.; NAGHAVI, M. Global, regional and national burden of bladder cancer and its attributable risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2019. **BMJ Global Health**, v. 6, n. 11, p. e004128, nov. 2021.

SANGSTER-GUITY, N. et al. ATR mediates cisplatin resistance in a p53 genotype-specific manner. **Oncogene**, v. 30, n. 22, p. 2526–2533, 24 jan. 2011.

SILVA, D. F. et al. Cytotoxic effects of Euterpe oleracea Mart. in malignant cell lines. v. 14, n. 1, 29 maio 2014.

SILVA, M. A. C. N. DA et al. Açai (Euterpe oleracea Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3546, 10 jun. 2021.

SINGH, P. et al. Non-invasive diagnostic potential of microRNA-203 in liquid biopsy of urothelial carcinoma of bladder. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 20 abr. 2022.

ULBRICHT, C. et al. An Evidence-Based Systematic Review of Acai (Euterpe oleracea) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 2, p. 128–147, 17 maio 2012.

USTaskForce. Screening Adults for Bladder Cancer. US: TaskForce Preventive Services, 2021. Disponível em: <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/document/literature-surveillance-report/bladder-cancer-in-adults-screening> Acesso em: 02 fev. 2024.

WITJES, J. A. et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. **European Urology**,

v. 79, n. 1, p. 82–104, jan. 2021.

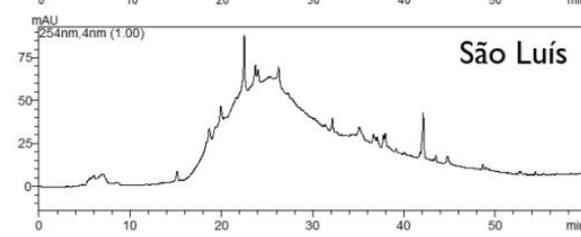
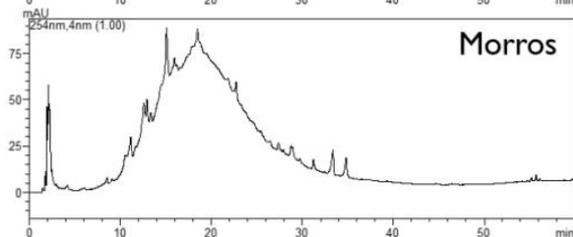
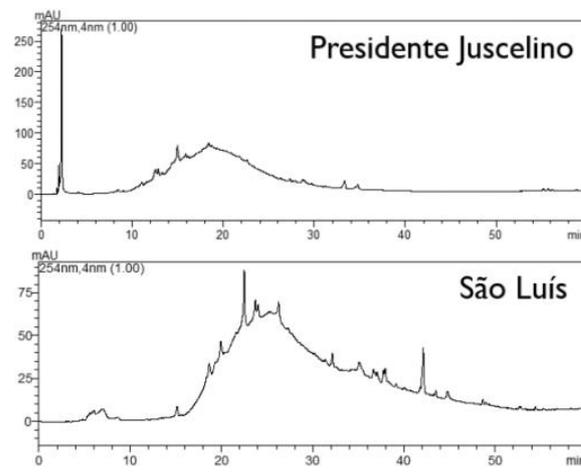
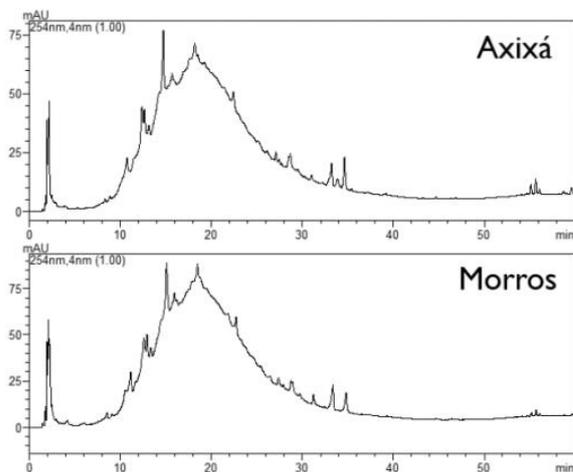
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer control : knowledge into action : WHO guide for effective programmes. [Module 3]**, Policy and advocacy. Geneva: World Health Organization, Cop, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guide to cancer early diagnosis. Geneva: World Health Organization; 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254500> Acesso em: 02 fev. 2024.

WYCOFF, W. et al. Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 181–187, ago. 2015.

YU, J.; CHEN, Q. The plant extract of Pao pereira potentiates carboplatin effects against ovarian cancer. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 36–43, 13 set. 2013.

Apêndice A – Cromatogramas dos extratos de semente de *Euterpe oleracea* Mart. provenientes dos quatro municípios maranhenses



Apêndice B – Análise da espectrometria de massas dos extratos de semente de *Euterpe oleracea* Mart. provenientes dos municípios de São Luís (EOSL) e Presidente Juscelino (EOJ)

EOSL

ID	Tempo de retenção (min)	[M+H] ⁺	MS ⁿ	Composto
1	16	595 (M-H ₂ O)	288	Dímero de catequina
2	19	865	695; 577; 407; 289	Trímero de procianidina
3	30.5	865	727; 695; 575; 287	Isômero de trímero de procianidina
4	32.2	579	579; 427; 290	Isômero de dímero de catequina
5	32.9	1155	1029; 985; 579; 290	Procianidina tetrâmero-tipo B
6	34.3	867	579; 290	Trímero de procianidina
7	35.1	867	579; 290	Trímero de procianidina
8	36	867	579; 290	Trímero de procianidina
9	36.6	1155	867; 579	Isômero de procianidina tetrâmero-tipo B
10	37	867	579; 290	Trímero de procianidina
11	39.1	867	579; 291	Trímero de procianidina
12	40	722 (M-H ₂ O-2H)	579; 427; 290	Trímero de procianidina tipo B C-glicosilado
13	41.7	579	427; 291	Isômero de dímero de catequina
14	47.6	867	579; 427; 289	Isômero de trímero de procianidina
15	48.6	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina
16	50.7	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina

EOJ

ID	Tempo de retenção (min)	[M+H] ⁺	MS ⁿ	Composto
1	3.3	343	181	Cafeoil-glicose
2	16.3	595	288	Dímero de catequina
3	19	865	695; 577; 289	Trímero de procianidina
4	26.6	457	289; 163	(epi)galocatequina galato
5	30.5	865	727; 695; 575;	Isômero de trímero de procianidina

			287	
6	32.2	579	579; 427; 290	Isômero de dímero de catequina
7	32.9	1155	1029; 985; 579; 290	Procianidina tetrâmero tipo-B
8	34.3	867	579; 290	Trímero de procianidina
9	35.1	867	579; 290	Trímero de procianidina
10	36	867	579; 290	Trímero de procianidina
11	36.6	1155	867; 579	Isômero de tetrâmero de procianidina tipo B
12	36.9	867	579; 290	Trímero de procianidina
13	39	867	579; 291	Trímero de procianidina
14	40.2	722	579; 290	Trímero de procianidina tipo B C-glicosilado
15	41.7	579	427; 291	Isômero de dímero de catequina
16	45.2	867	579; 427; 289	Isômero de trímero de procianidina
17	48.6	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina
18	50.7	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina

Anexo A – Principais instruções para submissão de manuscritos na Revista Einstein (São Paulo)

“Original Article - Original Articles report results of scientific research relevant to medicine and health, including clinical, translational and basic research. The article must be original and unpublished and contain the following items: 1) Structured Abstract (Objective, Methods, Results, Conclusion), 2) Introduction, 3) Methods, 4) Results, 5) Discussion, 6) Conclusion, and 7) References. Original Articles should not exceed 4,500 words, 250-word Abstract, up to 7 figures/tables and 50 references. All articles are peer-reviewed.

Title: title of the article, in English, which should be concise but informative.

Abstract: abstract, in English, limited to 250 words. For original articles, abstracts should be structured (Objective, Methods, Results, Conclusion), describes the main parts of the work and highlights the most relevant data. For articles of other sections, the abstract should not be structured.

Keywords: provide at least 5 and no more than 10 keywords, in English reflecting the content of the paper. Keywords must be based on the Medical Subject Headings (MeSH) of the National Library of Medicine, and available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>.

Text: text must comply with the structure required for each category of article. Citations of authors in the text must be numbered sequentially, by superscript Arabic numerals in parentheses. The complete definition of abbreviations and acronyms should be written before their first use in the text. Do not use abbreviations or acronyms in title and abstract. In table and figure legends, the abbreviations must be followed by the full term.

References: they must be numbered consecutively in the same order they appear in the text, and identified by Arabic numerals. References follow the “Vancouver Style”, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journals Indexed in Index Medicus, of the National Library of Medicine, available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>. For any references, mention up to six authors. In case of more than six authors, mention the first six, followed by et al., as shown in the following by et al.”

Anexo B – Status de Publicação de “The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review” (Capítulo 2) na Revista Einstein (São Paulo)

ScholarOne Manuscripts™ Pedro Ivo de Sousa Neto ▾ Instructions & Forms Help Log Out

 einstein (São Paulo)

[Home](#) [Author](#)

Author Dashboard

Author Dashboard

- 1 Unsubmitted and Manuscripts in Draft >
- 2 Manuscripts with Decisions >
- [Start New Submission](#) >
- [5 Most Recent E-mails](#) >

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
	✉ Contact Journal ADM: Journal, Einstein <ul style="list-style-type: none"> • Accept (04-Jan-2024) view decision letter	EINS-2023-0611.R1	The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review View Submission	26-Dec-2023	04-Jan-2024
a revision has been submitted (EINS-2023-0611.R1)	✉ Contact Journal ADM: Journal, Einstein	EINS-2023-0611	The role of the microRNAs in the non-invasive diagnosis of bladder cancer: a systematic review	01-Jun-2023	21-Nov-2023