

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Potencial imunoterapêutico de cepa recombinante de *Mycobacterium bovis* BCG
em linhagem celular de câncer de bexiga**

Camila Bonemann Bender

Pelotas, 2016

Potencial imunoterapêutico de cepa recombinante de *Mycobacterium bovis* BCG em linhagem celular de câncer de bexiga

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora acadêmica: Prof.^a Dr.^a Fabiana Kömmling Seixas

Orientadora de estágio: Dr.^a Karine Rech Begnini

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B458p

Bender, Camila Bonemann

Potencial imunoterapêutico de cepa recombinante de *Mycobacterium bovis* BCG em linhagem celular de câncer de bexiga / Camila Bonemann Bender. – 42f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2017. – Orientadora Fabiana Kömmling Seixas.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Dirson (*in memoriam*) e Neldi
e a minha irmã, Fernanda.
Por todo carinho e amor e por me
guiarem pelo caminho certo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, Neldi, por sempre ter sido um exemplo de caráter e dedicação e por não ter medido esforços para que eu chegasse até aqui. A minha irmã, Fernanda, por todo o incentivo, amor, conselhos e por ter segurado as pontas nos momentos em que não pude estar presente. Ao meu cunhado Jardel e meu padrasto Neri por sempre se fazerem presentes. Aos meus tios Rosane e Alcides, pelos conselhos e incentivo. Aos meus avós, Edith e Edwino (*in memoriam*), por todo carinho, amor e por entenderem os momentos de ausência.

A minha orientadora professora Fabiana, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança. A minha orientadora de estágio Karine, obrigada pelos ensinamentos, por compartilhar seus conhecimentos e principalmente pelo empenho em tornar esse trabalho possível.

Aos professores do curso de Graduação em Biotecnologia, pelo aprendizado, pela amizade, pelos conselhos e pela educação de qualidade.

Aos demais colegas e funcionários e colegas da Biotecnologia pela boa convivência e aprendizado.

Aos colegas e amigos do GPO, pelo companheirismo, amizade, pela colaboração no trabalho e pelas boas conversas na hora do café.

Aos amigos do Pequidão do Goiás, Pati, Nati, Luíza, Leina e aos irmãos que Pelotas me deu, Carol e Giovanni, obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por tornar essa caminhada mais divertida e cheia de boas histórias. Aos amigos de Pelotas, Roberta, Jhonny e Carlos, pela amizade e companheirismo. Aos colegas de graduação, por dividirem este momento ímpar. À Nati, Lari, Raquel e Mica, pela amizade, companheirismo, por ter com quem contar nos momentos de estresse e de alegria. Aos amigos do CSF, Murilo, Alysson, Tiago, Guilherme e Layara, pela amizade e por tornarem os 18 meses no EUA uma aventura diária.

Muito obrigada!

Eu vos digo: é preciso ter o caos em si,
para poder dar à luz uma estrela dançante.
Eu vos digo: ainda tendes um caos dentro de vós.

Friedrich Nietzsche

Resumo

BENDER, Camila Bonemann. **Potencial imunoterapêutico de cepa recombinante de *Mycobacterium bovis* BCG em linhagem celular de câncer de bexiga**. 2016. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer de bexiga é o segundo tipo de câncer que mais atinge o trato genitourinário e um dos tipos de malignidades que apresenta um dos maiores custos de tratamento. Carcinomas de bexiga podem ser divididos em músculo-invasivos e não-músculo invasivo, sendo que o último é a forma mais comum que a doença se apresenta. Tumores de bexiga começam como tumores não-músculo invasivo que podem progredir para tumores invasivos se não tratados de maneira correta. O tratamento padrão ouro para os tumores não-músculo invasivos é ressecção transuretral (TUR) seguida de imunoterapia com *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG). O BCG é capaz de diminuir as taxas de recidiva e progressão deste tipo de câncer, porém a problemática envolvendo o tratamento com BCG são os pacientes que não são responsivos ao tratamento. Assim a fim de superar essa questão, algumas estratégias surgiram, dentre elas está a construção de cepas recombinantes de BCG capazes de expressar tanto genes do próprio BCG como também de genes exógenos. Um dos genes potenciais é do antígeno Ag85B, o qual é expresso pelas micobacterias durante as infecções. Os efeitos da cepa recombinante de BCG Ag85B foram avaliados em células de bexiga tumorais humanas da linhagem 5637 através da análise da expressão de citocinas, genes de estresse oxidativo e genes apoptóticos. Diferenças estatísticas não foram observadas entre a cepa recombinante e a cepa atualmente utilizada.

Palavras-chave: Câncer de bexiga; imunoterapia; BCG; Antígeno Ag85B.

Abstract

BENDER, Camila Bonemann. **Immunotherapeutic potential of a recombinant strain of *Mycobacterium bovis* BCG in a cellular strain of bladder cancer**. 2016. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Bladder cancer is the second type of cancer that reaches the genitourinary tract. It's one of the malignities that present one of the highest costs of treatment. Bladder cancer can be divided into muscle-invasive and non-muscle-invasive. The last one is the most common form of the disease. Bladder tumors start as non-muscle-invasive that can progress into muscle-invasive if not treated in the correct way. The treatment that is approved by Food and Drugs Administration (FDA) is the transurethral resection followed by immunotherapy with *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG). BCG is able to decrease the recurrence rates and the progression to muscle-invasive. The problem involving the treatment with BCG is the patients that do not respond to the treatment. This way, one of the possibilities to this problem is the development of recombinant strains of BCG able to express BCG genes or exogenous genes. One potential gene to make this improvement is the antigen Ag85B. This antigen is expressed by mycobacteria during infections. The recombinant strain of BCG Ag85B was tested in bladder cancer cells line 5637. Experiments were made to test cytokine expression, oxidative stress genes and apoptotic genes. Statistical differences were not detected between recombinant and non-recombinant strains.

Key words: Bladder cancer; immunotherapy; BCG; Ag85B antigen.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo envolvido na imunoterapia com BCG para câncer de bexiga.....	22
Figura 2	Expressão gênica das citocinas: interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e TRAIL em células de câncer de bexiga tratadas com BCG	28
Figura 3	Expressão gênica relativa de MDM2 e p53 em células de câncer de bexiga tratadas com BCG.....	29
Figura 4	Expressão gênica de TNF- α em células de câncer de bexiga tratadas com BCG.....	29
Figura 5	Expressão gênica de ULBP2 em células de câncer de bexiga tratadas com BCG.....	30
Figura 6	Expressão gênica relativa de Óxido Nítrico (iNOS) em células de câncer de bexiga tratadas com BCG.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1	Primers utilizados na reação de Real Time PCR	26
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ag85B – Antígeno 85B

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

CFU – Unidade formadora de colônias

CIS - Carcinoma *in situ*

cDNA – DNA complementar

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FSB – Soro fetal bovino

GM-CSF – Fator estimulatório de formação de colônia granulócito-macrófago

GPDH – Gliceraldeido-3 fosfato desidrogenase

ICAM – Molécula de adesão intracelular

IFN – Interferon

IFN- α Interferon alfa

IFN - γ - Interferon gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-12 – Interleucina 12

IL-18 – Interleucina 18

iNOS – NOS induzida

MCNA – Ácido nucléico de parede celular de micobactéria

MDM2 – *Murine double minute 2*

MHC – Complexo de histocompatibilidade

MMC – Mitomycim C

NK - Natural killer

OADC – *Oleic Albumin – dextrose – catalase*

p53 – Proteína celular supressora de tumor

PBS – Tampão fosfato salino

PTEN – Proteína homóloga de fosfatase e tensina

RAS – Proteína de sarcoma de rato

Real Time PCR (qRT – PCR) – Reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcriptase reversa

TAAS – Antígenos associados a tumores

TRAIL – Fator de necrose tumoral relacionado ao ligante indutor de apoptose

TNF – Fator de necrose tumoral

TUR – Ressecção transuretral

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.1.1 Objetivos específicos.....	15
3. Revisão da literatura.....	16
3.1 Câncer de bexiga.....	16
3.1.1 Epidemiologia e fatores de risco.....	16
3.1.2 Classificação dos tumores de bexiga.....	17
3.1.3 Tratamento do câncer de bexiga.....	17
3.1.3.1 Imunoterapia.....	18
3.2 <i>Mycobacterium bovis</i> Bacille Calmette-Guérin (BCG).....	19
3.2.1 Histórico da utilização do BCG.....	19
3.2.2 Mecanismo de ação do BCG.....	20
3.2.3 BCG recombinante.....	22
3.3 Antígeno Ag85B.....	24
4. Metodologia.....	25
4.1 Cultivo celular.....	25
4.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	25
4.3 Real time quantitativo PCR (qRT-PCR).....	25
4.4 Análise dos resultados.....	26
5. Resultados.....	28
6. Discussão.....	31
7. Conclusões e Perspectivas.....	34
8. Referências.....	35

1. Introdução

O câncer de bexiga é o quarto tipo de câncer mais comum, sendo responsável por 7% das malignidades ao redor do mundo (JEMAL et al, 2010). Os tumores de bexiga tem origem em uma única célula transformada que prolifera e acaba colonizando outras regiões da bexiga, sendo que, isto ocorre por meio de migração intraepitelial ou quando a célula mutada é transportada pela urina (HAFNER, 2002). Os tumores de bexiga podem ser músculo invasivos ou não-músculo invasivos, sendo os não-músculo invasivos considerados os mais comuns (DYRSKJ et al, 2007). O tratamento padrão para esse tipo de tumor é ressecção transuretral seguida de imunoterapia com *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) (HERR, 1992).

Dentre as problemáticas que envolvem o câncer de bexiga esta o grande número de pacientes que sofrem recidiva e progressão para tumores músculo invasivos (BADJUK et al, 2013). Além disso, o custo para o tratamento deste tipo de câncer é alto totalizando um gasto de 3.7 bilhões de dólares ao sistema de saúde americano no ano de 2011 (BOTTEMAN et al, 2003).

Assim sendo, o desenvolvimento de cepas recombinantes de BCG surgem como uma possibilidade para o tratamento do câncer de bexiga (HALL et al, 2007). Estudos nesta área buscam a superexpressão de antígenos do BCG sendo uma alternativa já utilizada a expressão do antígeno Ag85B e a introdução de antígenos exógenos (BEGNINI et al, 2015), a fim de tornar a terapia com BCG mais eficaz e menos onerosa. Dessa maneira, nosso trabalho tem como objetivo a busca por uma melhora na terapêutica da imunoterapia de câncer de bexiga.

1. Objetivos

1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar os efeitos de duas cepas recombinantes de *Mycobacterium bovis* BCG superexpressando a proteína Antígeno 85B (Ag85B) em células de câncer de bexiga

1.1.1 Objetivos Específicos

Avaliar o perfil de expressão gênica da linhagem de carcinoma de bexiga, para genes envolvidos em processos de apoptose e de ciclo celular, após tratamento com cepa recombinante de *M. bovis* expressando Ag85B.

Avaliar a expressão gênica de interleucinas em linhagem de carcinomas de bexiga, após tratamento com cepa recombinante de *M. bovis* expressando Ag85B.

Avaliar a expressão gênica de genes relacionados ao estresse oxidativo em linhagem de carcinomas de bexiga, após tratamento com cepa recombinante de *M. bovis* expressando Ag85B.

2. Revisão da Literatura

2.1 Câncer de Bexiga

O câncer de bexiga é o segundo tipo de câncer que mais acomete o trato genitourinário, atrás somente dos carcinomas de próstata (TIRABOSCHI et al, 2002). Esse tipo de câncer possui altas taxas de mortalidade e morbidez se não tratado de maneira correta (KAMAT et al, 2016) sendo o responsável por aproximadamente 5% das mortes por câncer (SIEGEL, NAISHADHAM e JEMALA, 2015). Os carcinomas de bexiga acometem comumente pessoas de idade média, o que indica que sua incidência e prevalência irá aumentar em um futuro próximo. A maioria destes tumores são diagnosticados em estágios iniciais o que os torna potencialmente curáveis (MORALES e COHEN, 2016).

Apesar de os carcinomas de bexiga serem o quinto tipo de câncer mais comum nos Estados Unidos, ele é o tipo de câncer mais oneroso para o tratamento por paciente (\$96.000 - \$187.000 dólares). Isso ocorre pelo fato deste tipo de câncer ser bastante similar a doenças crônicas exigindo assim um tratamento invasivo e prolongado (SIEVERT et al, 2009; KAPLAN et al, 2013).

Cancers de bexiga estão associados com alterações que representam instabilidade genômica como mutações no gene supressor de tumor p53 (MALMSTROM et al, 2002), mutações em genes da família RAS (PRZYBOJEWSKA et al, 2000) e alterações em regiões de microssatélite do cromossomo 9 (TURYN et al, 2006).

2.1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

Para o ano de 2016 há uma estimativa de 9.670 novos casos de câncer de bexiga para o Brasil (INCA 2016) e são esperados 430.000 novos casos ao redor do mundo. Nos Estados Unidos são esperados 74.000 pacientes diagnosticados com câncer de bexiga (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

O câncer de bexiga é o quarto tipo de câncer em incidência para homens e o décimo primeiro em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Para o ano de 2016 são esperados 7.200 novos casos de câncer de bexiga em homens e 2.470 casos em mulheres. Além disso, espera-se que 2.542 homens e 1.099 mulheres venham a morrer desse mal (INCA, 2016). Nove entre dez pessoas diagnosticadas com esse tipo de malignidade possuem aproximadamente 65 anos. Pessoas brancas possuem duas

vezes mais chances de desenvolver câncer de bexiga do que pessoas negras, hispânicos e asiáticos (WANG e SUN, 2014).

O maior fator de risco associado aos carcinomas de bexiga é o tabagismo, o risco de fumantes desenvolverem câncer de bexiga é 4 vezes maior do que em não fumantes. Em torno de metade dos tumores de bexiga, tanto em homens quanto em mulheres, são atribuídos ao tabagismo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). O risco de câncer de bexiga também é aumentado em pessoas que possuem exposição ocupacional a aminas aromáticas, infecções por *Schistosoma hematobium*, infecções urinárias recorrentes, pessoas que possuem certos defeitos de nascença na bexiga e consumo excessivo de café. Além disso, o risco pode ser aumentado em pessoas que vivem em comunidades com altos níveis de arsênico na água (ZEEGERS et al 2000, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

2.1.2 Classificação dos tumores de bexiga

A grande maioria dos cânceres de bexiga são carcinomas uroteliais sendo que 75% deles são tumores de bexiga não-músculo-invasivo e 25% são tumores músculo invasivos. Os tumores não-músculo invasivos são classificados como sendo de baixo ou alto grau de malignidade (KAMAT et al, 2016). Cerca de 50% dos tumores não-músculo invasivos são de baixo grau enquanto a maioria dos tumores músculo invasivos ou metastáticos são de alto grau (MOCH et al, 2016). Morfologicamente esses tipos de tumores podem ser divididos em papilares, sólidos e mistos. Os tipos papilares são predominantes, principalmente em tumores não-músculo invasivos (KAMAT et al, 2016).

Os carcinomas de bexiga não-músculo invasivos são conhecidos por possuírem altas taxas de recidiva (69-80%) e de evoluírem para tumores músculo-invasivos (33-48%) (DYRSKJ et al 2007; SYLVESTER et al, 2005). Os carcinomas superficiais de bexiga, em sua maioria, tem origem de uma única hiperplasia urotelial nodular sendo que se tratados nas fases iniciais por ressecção cirúrgica e imunoterapia intravesical, a taxa de sobrevida chega a 90% em cinco anos (WU, 2005).

2.1.3 Tratamento do câncer de bexiga

O tratamento para câncer de bexiga não-músculo invasivo baseia-se inicialmente na realização de uma ressecção transuretral (TUR), a qual é usada tanto

como um tratamento padrão dos carcinomas de bexiga quanto para o diagnóstico do mesmo. O objetivo desta ressecção é remover toda a lesão visível na bexiga e fornecer tecido para uma avaliação histopatológica do tumor (BADJUK et al, 2013).

Indica-se a utilização de tratamento adjuvante à TUR, principalmente administrado através de terapia intravesical. A terapia intravesical utilizada, entrega grandes concentrações de agentes terapêuticos na bexiga, destruindo células tumorais que permanecem após a TUR (HOUGHTON et al, 2013). As duas categorias de terapia intravesical adjuvante incluem imunoterapia e quimioterapia. O tratamento padrão ouro (aprovado em 1990 pela FDA) para os tumores não-músculo invasivos é a instilação intravesical de BCG, principalmente para pacientes com carcinoma *in situ* (CIS) (HALL et al, 2007; AMIRKHAH et al, 2009; BADJUK et al, 2011; BRAUSI et al, 2011; CLARK et al, 2013). A utilização de tratamento adjuvante ajuda na prevenção de recorrência e progressão dos tumores. O tratamento para tumores invasivos são baseados em cistectomia radical da bexiga e quimioterapias. As taxas de sobrevida são baixas em torno de 6% em dois anos (WU, 2005).

Cerca de 30-45% dos pacientes tratados com BCG não respondem ao tratamento (HALL et al, 2007). O tratamento indicado para estes pacientes não responsivos ao BCG é a cistectomia radical (BRAUSI et al, 2010). Ainda não existe um tratamento intravesical padrão para estes pacientes, os tratamentos disponíveis são interferon-alpha (INF α) e BCG além de alguns quimioterápicos como valrubicina, gencitabina e mitomycin C (MMC), epiribicin, docetaxel, paclitaxel e complexo de ácido nucleico da parede celular de micobacteria (MCNA) (WITJES, 2007; LAUDANO et al, 2010; YATES e ROUPRET, 2011; MCKIERNAN et al, 2014; PATEL et al, 2015,).

2.1.3.1 Imunoterapia

A imunoterapia pode ser vista como uma terapia anticâncer que atua ativando o sistema imune na luta contra malignidades gerando uma resposta ativa contra antígenos associados a tumores (TAAS). Sendo assim ela é um tratamento alternativo baseado na especificidade do sistema imunológico e em sua limitada toxicidade (ALDRICH et al, 2010; SHENG e HUANG, 2011; HUANG et al, 2012; KIM, 2016). A resposta imune do hospedeiro contra as células tumorais é baseada na sua interação com o microambiente do tumor (KIM, 2016). A ativação do sistema imune para o tratamento de malignidades é uma importante ferramenta, não apenas pela

especificidade da resposta imune como pela possibilidade da geração de uma resposta imune duradoura através de células de memória (ALDRICH et al, 2010). As citocinas que são produzidas no microambiente do tumor tem um importante papel na progressão dos tumores, já que são liberadas em resposta a infecção, inflamação e imunidade podendo funcionar inibindo o desenvolvimento e a progressão de tumores (DRANOFF, 2004).

Diferentes estratégias terapêuticas surgiram para o tratamento de doenças malignas, incluindo diversos esquemas de vacinação, terapias com citocinas e terapias com anticorpos monoclonais (ALDRICH et al, 2010). Neste sentido, passou-se a utilizar instilações intravesicais de BCG, que é a terapia imunológica mais efetiva para o tratamento de câncer de bexiga não-músculo invasivo (KAMAT et al, 2014).

2.2 *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)

2.2.1 Histórico da utilização do BCG

O início da utilização de *Mycobacterium* na saúde data de 1908, quando Albert Calmette e Camille Guérin começaram estudos para o desenvolvimento de uma vacina contra a tuberculose. Em 1921, após 231 passagens eles conseguiram realizar a atenuação do mesmo para uma forma estável e não virulenta, dando origem a cepa de *M. bovis* conhecida como Bacille Calmette-Guérin ou BCG (HERR e MORALES, 2008).

Em 1929, Pearl observou em estudos de autópsia que pacientes com tuberculose haviam menor frequência de tumores (PEARL, 1929). Após estudos relacionando pacientes que morreram e sobreviveram ao câncer foi observado que os sobreviventes tinham tuberculose ou estavam curados da mesma. Pearl conclui então que existia algum mecanismo antagonista entre tuberculose e câncer, apesar de não conseguir explicar a maneira como esse processo ocorria (HERR e MORALES, 2008).

A possibilidade da utilização de BCG para o tratamento de câncer foi sugerida por Lloyd Old na década de 50. Old observou que ratos tratados com BCG apresentavam resistência a transplantes de tumores. A ação do BCG foi indireta e mediada pelo hospedeiro, levando a hipóteses sobre reação imune. Assim, Old descobriu o fator de necrose tumoral (OLD, CLARKE e BENACERRAF, 1959). Na década de 70, Zbar estabeleceu que o critério para se obter sucesso na terapia com BCG era o contato direto entre o microrganismo e as células tumorais (ZBAR e TANAKA, 1971). Por fim, em 1976, Alvaro Morales testou o uso tópico de BCG em

tumores superficiais de bexiga estabelecendo instilações intravesicais como sendo o método de aplicação (MORALES e BRUCE, 1976). Em 1990, o FDA aprovou o tratamento com BCG como sendo o tratamento padrão ouro para carcinomas *in situ*. Instilações intravesicais de BCG tem sido usadas tanto para evitar a progressão de tumores de bexiga como a recorrência dos mesmos (BADJUK et al, 2011).

2.2.2 Mecanismo de Ação do BCG

Apesar de o uso de BCG na terapêutica do câncer de bexiga ocorrer a quatro décadas, seu mecanismo de ação ainda está sob investigação (REDELMAN-SIDI, GLICKMAN e BOCHNER, 2014). Dentre os requisitos necessários para ação adequada do BCG estão a administração em indivíduos com sistema imune intacto (MORTON et al, 1970; ZBAR e RAPP, 1974). Outro requisito é utilização de BCG vivo uma vez que cepas vivas promovem o recrutamento de linfócitos T para a bexiga enquanto a utilização de cepas atenuadas não promove o mesmo efeito (ZBAR e TANAKA, 1971; KELLEY et al, 1985; BIOT et al, 2012). E por fim, há a necessidade de contato próximo entre o BCG e as células de câncer de bexiga. Estudo em modelos animais mostraram que o BCG necessita ser administrado próximo da lesão para alcançar seu efeito (ZBAR et al, 1972).

A resposta imune ao BCG tem início com a interação entre o BCG e as células do urotélio (REDELMAN-SIDI, GLICKMAN e BOCHNER, 2014), sendo que o passo inicial é a ligação do BCG às células do urotélio. Isto ocorre através da ligação a fibronectinas (RATLIFF et al, 1987; HUDSON et al, 1991) (Figura 1), as quais ligam-se as células do urotélio por meio da integrina $\alpha 5\beta 1$ (ZHAO et al, 2000). A ligação do BCG ocorre predominantemente em locais onde o urotélio foi química ou eletricamente danificado (SCHNEIDER et al, 1994; BEVERS, KURTH e SCHAMHART, 2004). As células de câncer de bexiga possuem a capacidade de internalizar o BCG por meio de macropinocitose (REDELMAN-SIDI et al, 2013), sendo necessário a presença de alterações genéticas como nos oncogenes PTEN e RAS (HUANG et al, 2012). As células de câncer de bexiga após a internalização secretam efetores imunoativadores, sendo que a principal citocina estudada é a IL-6 que é liberada por células de câncer de bexiga expostas ao BCG (ESUVARANATHAN et al, 1995). A IL-6 age então recrutando neutrófilos ou aumentando a expressão de integrina $\alpha 5\beta 1$ que aumenta a ligação de BCG ao urotélio (SHANG et al, 2000). Outras citocinas secretadas por

células de câncer de bexiga são IL-8, fator estimulatório de formação de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) e TNF (DE REIJEKE et al, 1993; ZHANG et al, 1999). Além disso, terapias com BCG podem regular positivamente a expressão de MHC II e ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1) (EL-DEMIRY et al, 1987; PRESCOTT et al, 1989; JACKSON et al, 1994), que juntamente com as células dendríticas irão recrutar células do sistema imune para o local resultando em citotoxicidade para as células de câncer de bexiga. Dentre as células do sistema imune recrutadas encontram-se granulócitos, linfócitos CD4⁺, linfócitos CD8⁺, linfócitos exterminadores naturais (Natural Killer) e macrófagos (REDELMAN-SIDI, GLICKMAN e BOCHNER, 2014).

Diversas citocinas estão envolvidas na resposta as instilações com BCG, estando dentre as mais importantes a IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4, TRAIL, IL-8 e IL-18. TRAIL é um membro da família TNF que é expresso em varias células do sistema imune, incluindo linfócitos citotóxicos, linfócitos Natural Killer e neutrófilos. TRAIL induz apoptóse em células tumorais, mas não em células normais, devido a sua ligação aos receptores de morte da família TNF (WANG e EL-DEIRY, 2003). A especificidade que existe de TRAIL por células tumorais pode ser um indicativo da seletividade que existe pela resposta imune induzida por BCG para as células de câncer de bexiga (LUDWIG et al, 2004). Altos níveis de IL-2 na urina de pacientes tratados com BCG é associado com a redução das chances de recorrência de câncer de bexiga (DE REIJEKE et al, 1993; SAINT et al, 2003; WATANABE et al, 2003).

Outro mecanismo que o BCG pode ativar após a ligação do mesmo às células do urotélio é a ativação de células dendríticas. Estas células então ativam linfócitos T e linfócitos natural killer a induzir toxicidade contra células de câncer de bexiga infectadas por BCG (REDELMAN-SIDI, GLICKMAN e BOCHNER, 2014).

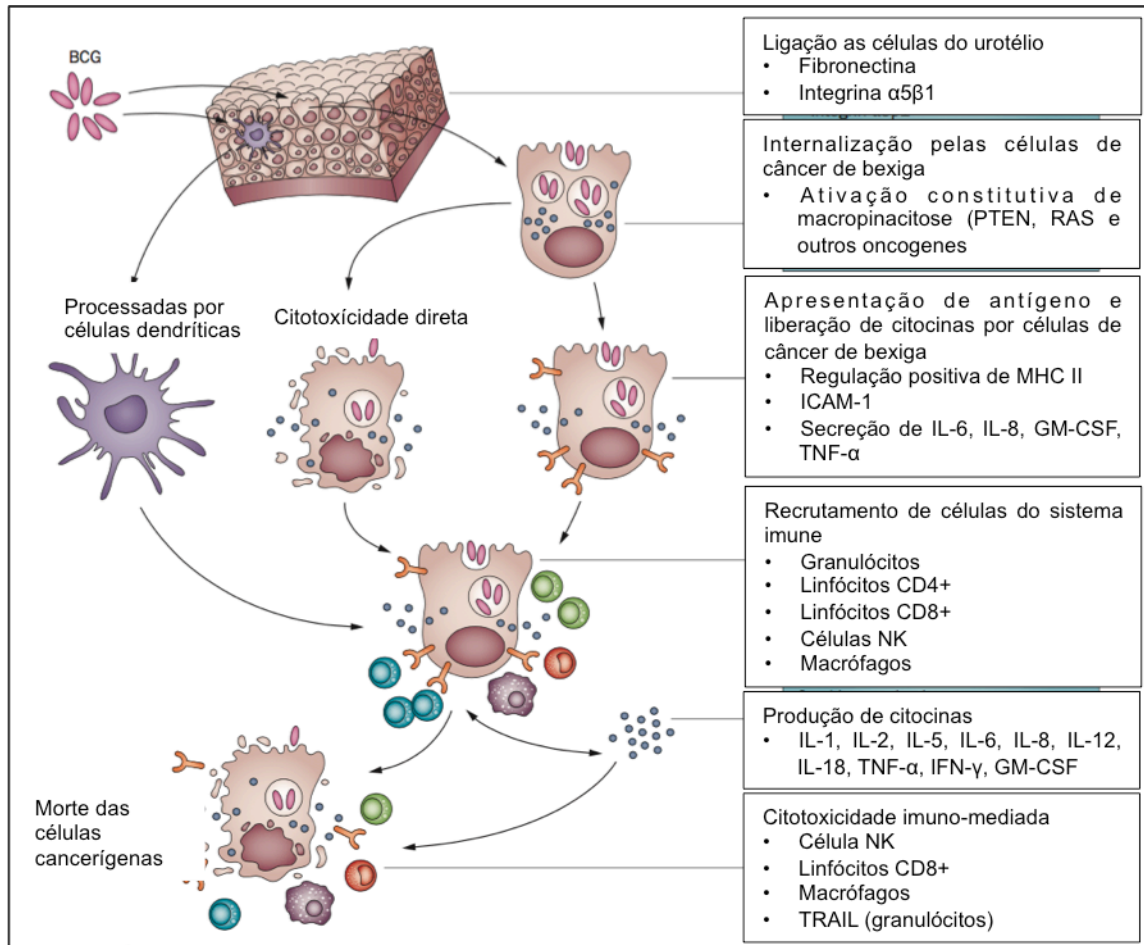


Figura 1: Mecanismo envolvido na imunoterapia com BCG para câncer de bexiga. Após a ligação no urotélio, o BCG é internalizado por células de câncer de bexiga. Após a internalização, células de câncer de bexiga realizam a regulação positiva da expressão de MHC II e ICAM-1, e secretam citocinas que juntamente com as células dendríticas irão recrutar células do sistema imune para o local, resultando em citotoxicidade para as células tumorais. Abreviações: BCG – Bacillus Calmette-Guérin; GM-CSF – fator estimulatório de formação de colônia granulócito-macrófago; ICAM – molécula de adesão intracelular; IFN – interferon; NK – Natural Killer; TNF – Fator de necrose tumoral; TRAIL – fator de necrose tumoral relacionado ao ligante indutor de apoptose. Adaptado de Redelman-Sidi, 2014.

2.2.3 BCG recombinante

O BCG se destaca pela sua utilização na imunoterapia para o tratamento de tumores sólidos (MORALES e COHEN, 2016). Apesar de ser um tratamento promissor, cerca de 30-45% pacientes tratados com BCG são não responsivos ao tratamento, apresentando efeitos colaterais locais e sistêmicos (BRAUSI et al, 2014). Atualmente, existem poucas opções de tratamento para estes pacientes além de cistectomia radical

havendo assim a necessidade de mais estudos nesta área como o desenvolvimento de cepas de BCG recombinantes (HALL et al, 2007).

Dentre as estratégias para diminuir os efeitos adversos e melhorar as respostas, está a utilização de doses menores de BCG, utilização de citocinas inflamatórias associadas ao BCG, busca pela identificação de componentes micobacterianos responsáveis pela resposta imunológica. Este último fator evitaria a utilização do BCG vivo diminuindo assim os riscos de infecções ou reações adversas. Por fim, a construção de cepas de BCG recombinantes que apresentem componentes da micobacteria ou genes exógenos (SCHENK-BRAAT et al, 2013; BANGMA et al, 2013).

Os estudos para o desenvolvimento da construção de cepas recombinantes de BCG tiveram início com a tecnologia do DNA recombinante. Estas construções tem o objetivo de melhorar as cepas tanto para o uso em vacinas contra a tuberculose como para o tratamento de câncer de bexiga. O desenvolvimento de vetores de expressão em micobacteria possibilitou a introdução de DNA exógeno na mesma, além de possibilitar que fossem capazes de expressar genes heterólogos (TULLIUS e HORWITZ, 2011). Um fator limitante para o desenvolvimento de BCG recombinante é o fato de haver poucos marcadores genéticos para a seleção das micobacterias recombinantes. Atualmente existem apenas marcadores relacionados à resistência a antibióticos, sendo geralmente a canamicina (BORSUK et al, 2007). Outra estratégia para seleção é a inserção genômica de genes de enzimas biosintéticas que permitem o crescimento de cepas recombinantes na falta de alguns nutrientes, como a valina (SHINNICK, 1997). Porém, estas alternativas não se mostram eficazes para mutações além do uso de cepas com resistência a antibióticos não estar disponível para utilização *in vivo* (SHINNICK, 1997; EDELMAN et al, 1999; MEDERLE et al, 2002).

Por fim, pode-se utilizar a complementação auxotrófica como marcador de seleção. Cepas auxotróficas são geneticamente modificadas pela deleção de genes envolvidos na síntese de metabólitos essenciais como aminoácidos. Essas deleções tornam estas cepas incapazes de sintetizar componentes necessários para seu crescimento (BORSUK et al, 2007; SAMPSON et al, 2011).

Estratégias vem sendo estudadas para uma melhora na resposta da imunoterapia com o uso do BCG. Dentre estas estratégias se encontra o desenvolvimento de cepas recombinantes expressando citocinas como IL-2 e IFN- α . A utilização de cepas recombinantes com a inserção de citocinas mostrou uma melhora na ativação e na citotoxicidade de macrófagos. Outra estratégia utilizada é o

desenvolvimento de cepas recombinantes capazes de expressar antígenos de micobactérias ou exógenos (BEGNINI et al, 2015).

2.3 Antígeno Ag85B

A parede celular das micobactérias possui um grande número de proteínas (WIKER e HARBOE, 1992). Dentre as proteínas associadas com a superfície das micobactérias que estão em cultura celular, estão as proteínas do complexo Ag85, as quais possuem um importante papel na patogênese da tuberculose. A sua principal contribuição para a virulência de *Mycobacterium tuberculosis* é devido o seu papel fisiológico na síntese dos lipídeos da parede celular (BELISLE et al, 1997; ARMITIGE et al, 2000). Fazem parte deste complexo os antígenos Ag85A, Ag85B e Ag85C (WIKER e HARBOE, 1992) codificados pelos genes *fbpA*, *fbpB* e *fbpC* respectivamente, que estão localizados em diferentes regiões genômicas (WIKER e HARBOE, 1992; HORWITZ et al, 1995). Ag85A e Ag85B estão entre os antígenos mais potentes. Quando expressados em diferentes sistemas de entrega estes antígenos apresentaram um aumento na proteção adquirida (CATALDI et al, 2010; McMURRAY, 2011). As proteínas do complexo Ag85 incluem antígenos estimulatórios TH1 e antígenos protetores que são comuns em BCG e em *M. tuberculosis* (DORHOI, REECE e KAUFMANN, 2011). O antígeno Ag85B tem sido muito estudado nos últimos anos por ser fortemente reconhecido por células T durante a primeira fase da infecção por micobactéria (MUSTAFA et al, 1998).

Testes em cepas de BCG expressando o antígeno Ag85B já foram realizados por Rizzi e colaboradores em 2012, onde uma cepa auxotrófica de BCG Pasteur recombinante para o antígeno Ag85B foi testada como vacina para tuberculose bovina. Begnini e colegas em 2013, testaram cepa recombinante de BCG expressando o antígeno Ag85B na imunoterapia de câncer de bexiga, obtendo resultados superiores aos obtidos com a cepa Pasteur.

3. Metodologia

3.1 Cultivo celular

Quatro cepas de BCG do tipo Pasteur, $\Delta leuD$, Pasteur/Ag85B (rBCG) e $\Delta leuD/Ag85B$ (rBCG) foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) suplementado com 0.5% de glicerol, 0.05% de Tween 80 e 10% de OADC (Oleic Albumin-dextrose-catalase) ou em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco Laboratories) suplementado com OADC. Para a cepas recombinante Pasteur/Ag85B foi adicionado canamicina com concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As cepas recombinantes foram desenvolvidas por Borsuk et al em 2007 e Begnini et al em 2013, são cepas de BCG recombinantes auxotróficas para o aminoácido leucina que expressa o antígeno Ag85B.

Células de carcinoma humano de bexiga da linhagem 5637 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FSB), 1% de L-lutamina e 1% de penicilina/streptomicina. Células foram mantidas em estufa à 37°C em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO_2 .

Para os experimentos, as células 5637 foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 6 poços e cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 24 horas. As células foram então pré-tratadas com 100 μM de ZnCl_2 por 24 horas. Na sequência, as células foram incubadas com as cepas de BCG (Pasteur, Pasteur/Ag85B, $\Delta leuD$ e $\Delta leuD/Ag85B$) a uma concentração aproximada de 1×10^6 CFU durante 48 horas.

3.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após o tratamento com BCG, as células foram lavadas com PBS- tampão fosfato salino (Vitrocell, Brasil). A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen TM). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1 μg de RNA e o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems TM, UK)

3.3 Real Time Quantitativo PCR (qRT-PCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Stratagene® Mx3005PTM Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) utilizando-se SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK) e primers específicos para genes humanos (IL-2, IL-12, TRAIL, p53, MDM2, ULBP2, TNF- α e iNOS) e para o gene normalizador GAPDH. A lista dos primers utilizados encontra-se na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas a 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os dados obtidos foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, de acordo com Livak et al (2001).

Tabela1: Primers utilizados na reação de Real Time PCR

Gene	Sequência
GAPDH	F- 3' GGAGCGAGATCCCTCCAA 5' R- 5' GGCTGTTGTCATACTTCT 3'
IL-2	F- 3' CCCAAGAAGGCCACAGAACTG 5' R- 5' CTTAAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAG 3'
IL-12	F- 3' GGGACAACAACAAGGAGTATGAGTA 5' R- 5' TTGAGCTTGTGAACGGCATC 3'
TRAIL	F- 3' ACTTTACCAACGAGCTGA 5' R- 5' CTTTCTAACGAGGCTGACG 3'
TNF- α	F- 3' AGCCTGTAGCCCATGTTGTAG 5' R- 5' CTCTCAGCTCCACGCCATTG 3'
MDM2	F- 3' GTGAATCTACAGGGACGCCAT 5' R- 5' CTGATCCAACCAATCACCTGAA 3'
p53	F- 3' CACGCCACGGATCTGAA 5' R- 5' AGCGAGCACTGCCCAACA 3'
ULBP2	F- 3' CAAGTGCAGGAGCACCCTCG 5' R- 5' CAGATGCCAGGGAGGATGAAGC 3'
iNOS	F- 3' ACAAGCCTACCCCTCCAGAT 5' R- 5' TCCCGTCAGTTGGTAGGT 3'

3.4 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguido de teste Tukey para comparações múltiplas. Resultados significativos foram considerados com valor de $P < 0.05$ em todas as análises. Resultados foram expressos com \pm SEM.

4. Resultados

4.1 Avaliação da expressão das interleucinas 2 e 12 e de TRAIL pela reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcriptase reversa (qRT-PCR)

Os níveis de expressão das citocinas IL- 2, IL-12 e TRAIL em células de câncer de bexiga (5637) tratadas com BCG foram avaliadas por qRT-PCR e estão demonstradas na Figura 2. As células foram tratadas com BCG Pasteur, Pasteur/Ag85B, Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B. Não foi possível observar diferenças na expressão gênica entre as cepas de BCG testadas ($P > 0.05$).

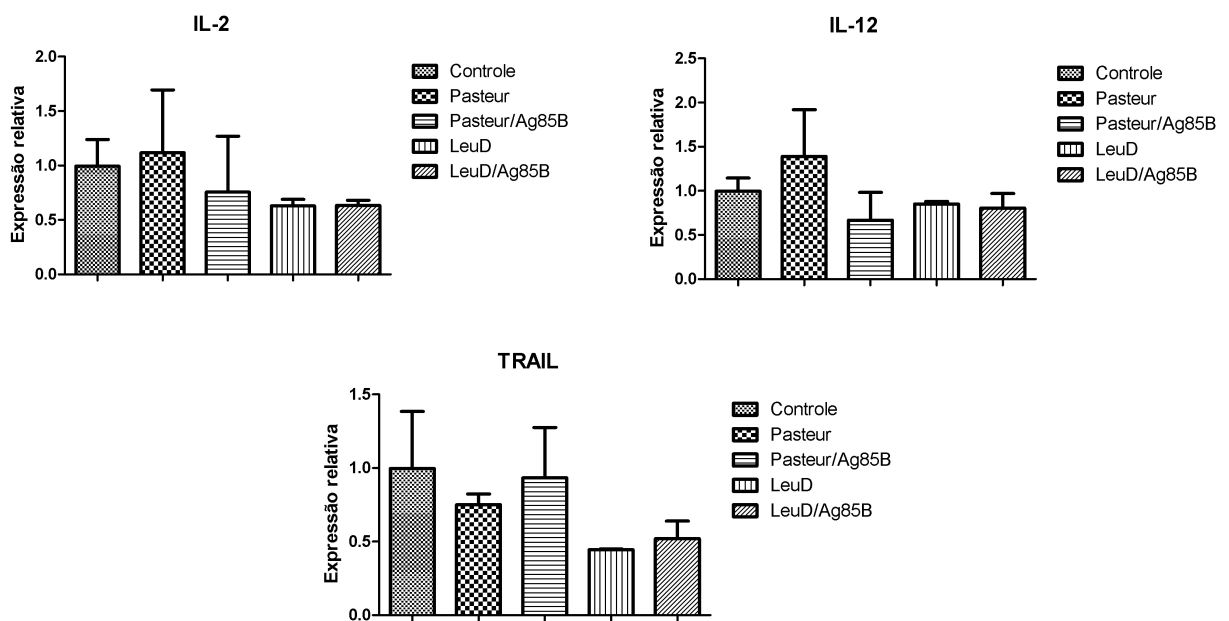


Figura 2: Expressão gênica das citocinas: interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-2) e TRAIL em células de câncer de bexiga tratadas com BCG :Pasteur; Pasteur/Ag85B; Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B. Não houve diferença nas taxas de expressão entre os grupos, $P > 0.05$.

4.2 Avaliação da expressão de p53 e MDM2 por Real Time PCR

A avaliação da expressão gênica de p53 e MDM2 em células de câncer de bexiga (5637) que foram tratadas com as diferentes cepas de BCG foram avaliadas por meio de qRT-PCR. Os níveis de expressão obtidos para estes dois genes estão demonstradas na Figura 3. Não foi possível observar diferenças na expressão gênica entre as cepas de BCG testadas ($P > 0.05$).

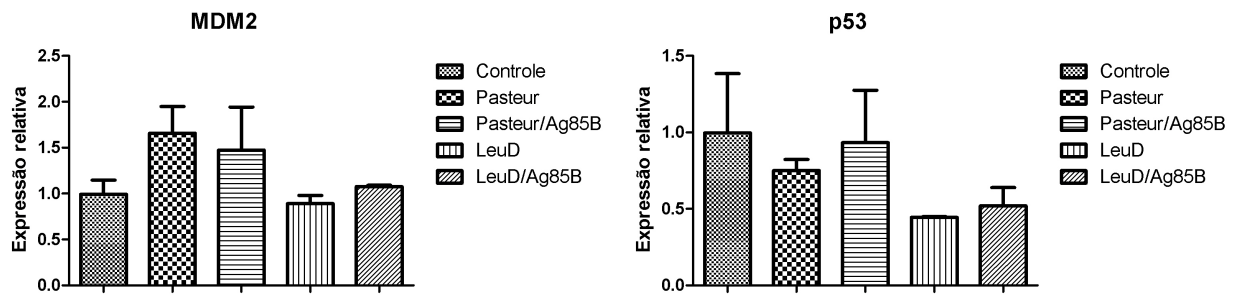


Figura 3: Expressão gênica relativa de MDM2 e p53 em células de câncer de bexiga tratadas com BCG: Pasteur; Pasteur/Ag85B; Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B.. Não houve diferença nas taxas de expressão entre os grupos, $P > 0.05$.

4.3 Avaliação da expressão de TNF- α por Real Time PCR

Os níveis de expressão relativa de TNF- α em células de câncer de bexiga (5637) tratadas com BCG foram avaliadas por qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa de mRNA estão demonstradas nas Figura 4. Não foi possível observar diferenças na expressão gênica entre as cepas de BCG testadas.

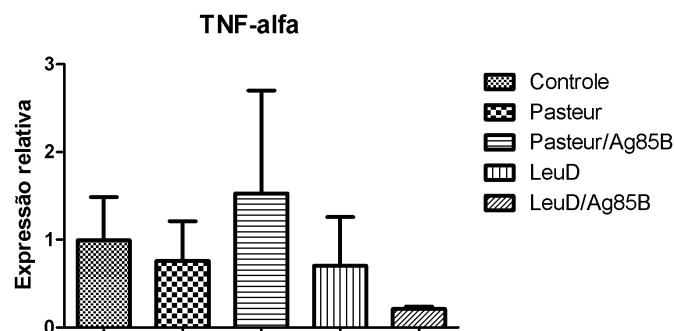


Figura 4 : Expressão gênica de TNF- α em células de câncer de bexiga tratadas com BCG: Pasteur; Pasteur/Ag85B; Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B. Não houve diferença nas taxas de expressão entre os grupos, $P > 0.05$.

4.4 Avaliação da expressão de ULBP2 por Real Time PCR

Os níveis de expressão relativa de mRNA em células de câncer de bexiga (5637) tratadas com BCG foram avaliadas por qRT-PCR para o gene ULBP2 e estão demonstradas na Figura 5. Não foi possível observar diferenças na expressão gênica entre as cepas de BCG testadas.

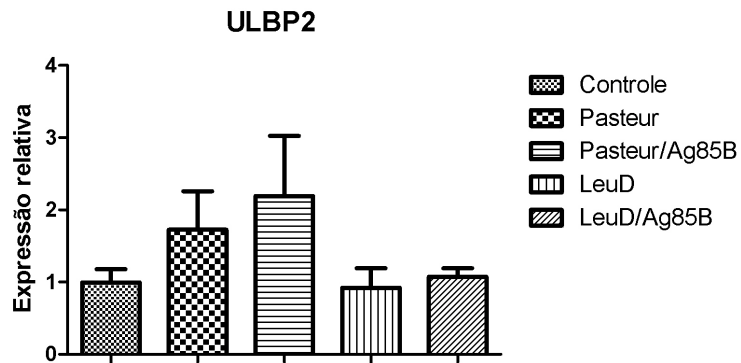


Figura 5: Expressão gênica de ULBP2 em células de câncer de bexiga tratadas com BCG: Pasteur; Pasteur/Ag85B; Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B. Não houve diferença nas taxas de expressão entre os grupos, $P > 0.05$.

4.5 Avaliação da expressão de iNOS por Real Time PCR

Os níveis de expressão de iNOS em foi avaliado em células de câncer de bexiga (5637) tratadas com BCG. A avaliação foi realizada por qRT-PCR e estão demonstradas nas Figura 6. Não foi possível observar diferenças na expressão gênica entre as cepas de BCG testadas.

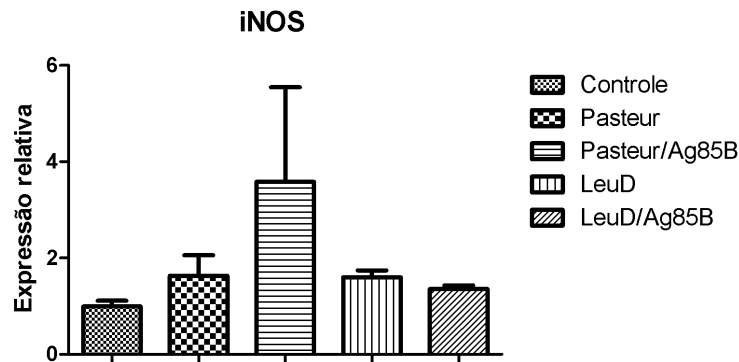


Figura 6: Expressão gênica relativa de Óxido Nítrico (iNOS) em células de câncer de bexiga tratadas com BCG: Pasteur; Pasteur/Ag85B; Δ LeuD e Δ LeuD/Ag85B. Não houve diferença nas taxas de expressão entre os grupos, $P > 0.05$.

5. Discussão

A utilização da cepa BCG vem sendo uma potencial ferramenta no tratamento imunoterápico de tumores sólidos de bexiga, nas últimas três décadas (BEGNINI et al, 2015; MORALES e COHEN, 2016). No entanto, apesar do BCG diminuir a recidiva e a progressão destes tumores, cerca de 30-45% dos pacientes não respondem ao tratamento e os tumores ressurgem em cerca de 50% dos acometidos (HALL, 2007; BEGNINI et al, 2015).

O desenvolvimento de cepas de BCG recombinante capazes de superexpressar antígenos de BCG ou de expressar antígenos exógenos vem sendo uma alternativa mais efetiva *in vitro* (BEGNINI et al, 2015). Um dos antígenos utilizados, Ag85B, é fortemente reconhecido por células T durante a primeira fase de infecção por micobactéria, aumentando a imunogenicidade de BCG além de induzir uma resposta imune robusta e de longa duração (MUSTAFA et al, 1998; JAGANNATH et al, 2009).

Em trabalho anterior, de 2013, Begnini et al avaliou a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, genes apoptóticos e genes relacionados ao estresse oxidativo na cepa de BCG recombinante Δ LeuD/Ag85B. Em seu trabalho, a cepa recombinante apresentou um aumento na expressão de genes pró-apoptóticos e de genes relacionados ao ciclo celular e uma diminuição na expressão de genes anti-apoptóticos, além de ter demonstrado um aumento na expressão de enzimas antioxidantes e das proteínas Bax e p53.

Em nossos estudos não foi possível observar diferenças de expressão gênica das citocinas IL-2, IL-12 e TRAILS entre as cepas de BCG recombinante e os controles. Acreditamos que isso pode ser devido ao tempo utilizado no tratamento ter sido inadequado já que, foi utilizado o tempo de 48 horas. Em outros estudos onde outras citocinas foram avaliadas, IL-8, o tempo para detecção das mesmas na urina foi de 8 horas (SAGNAK et al, 2009). Algumas citocinas são liberadas por células de câncer de bexiga após o tratamento com BCG. As IL-2 e IL-12 estão associadas a resposta imune TH1, sendo que essa resposta tem se mostrado fundamental para que o BCG possa ser efetivo (MCAVENEY, GOMELLA e LATTIME, 1994). Outra citocina envolvida na resposta do BCG é TRAIL. Níveis urinários dessa citocina foram encontrados mais elevados em pacientes que respondem ao tratamento com BCG do que na dos não responsivos (LUDWIG et al, 2004).

Em relação ao gene supressor de tumor p53, não foi observada alteração na sua expressão dentre os diferentes grupos. A inativação do gene supressor de tumor p53 e/ou superexpressão do oncogene MDM2 frequentemente ocorrem em carcinomas humanos e estão associados com prognóstico ruim, formas avançadas da doença e resistência ao tratamento (NAG et al, 2016). Por outro lado, o aumento da expressão de p53 pode levar a célula a uma parada do ciclo celular. Estudo realizado previamente por nosso grupo de pesquisa demonstra um aumento nos níveis de expressão de p53 após tratamento com cepa recombinante de BCG expressando Ag85B e parada do ciclo celular em fase G2/M, sugerindo assim uma atividade antiproliferativa da rBCG (BEGNINI et al, 2013). No entanto novos ensaios serão realizados para investigar as alterações que ocorreram na expressão deste gene.

O gene TNF- α , responsável por induzir a resposta inflamatória antitumoral através da ativação de células NK e células T CD8 (PREVOST-BLONDEL et al, 2000) não se mostrou alterado dentre os diferentes grupos testados. Estudos utilizando BCG recombinante expressando Ag85B mostraram um aumento na liberação de TNF- α durante a ativação de resposta TH1 (WANG e SUN, 2014; XU et al, 2009), entretanto os protocolos de cultivo utilizados, apresentam diferenças quando comparado ao utilizado no presente estudo.

Ao avaliar o gene ULBP2 também não foi identificadas diferenças entre os níveis de expressão nas cepas testadas, o que sugere que as células NK sejam recrutadas por outro mecanismo. O gene da ULBP2 codifica moléculas relacionadas ao MHC de classe I que se liga ao receptor NKG2D em células Natural Killer para então ativar a liberação de várias citocinas e quimiocinas que contribuem para o recrutamento seguido de ativação de linfócitos Natural Killer (WANG e SUN, 2014). As células mononucleares, mais especificamente, linfócitos NK são capazes de apresentar toxicidade contra células de câncer de bexiga infectadas por BCG (SONODA et al, 2007).

Tratando-se do gene iNOS, também não houve diferenças na expressão entre os tratamentos, levando a acreditar que outros mecanismos são ativados para que ocorra apoptose celular. O Óxido nítrico (ON) está envolvido no crescimento e diferenciação celular. Baixas concentrações de ON estimulam o crescimento celular enquanto altas concentrações resultam em efeitos citotóxicos (MORIOS et al, 1999). O óxido nítrico e outros fatores como TNF, IL-1, IL-12 tem sua expressão induzida pela ativação de Toll-like receptors (KLEINNIJENHUIS et al, 2011).

Nossos estudos não demonstraram diferenças na expressão dos genes avaliados. Acreditamos que o tempo utilizado para a avaliação da expressão de citocinas não tenha sido apropriado e que possivelmente há o envolvimento de outros mecanismos de ativação da resposta imune dos demais genes.

7. Conclusões e Perspectivas

A partir do que foi exposto, o presente trabalho sugere que a expressão dos genes de citocinas, genes de estresse e genes reguladores do ciclo celular avaliados não apresentam diferenças quanto a sua expressão entre as cepas de BCG avaliadas (Pasteur, Pasteur/Ag85B, $\Delta LeuD$ e $\Delta LeuD/Ag85B$).

Como nossos próximos passos, pretendemos avaliar a expressão das citocinas, com um tempo menor exposição ao BCG e analisar se outros genes estão envolvidos no processo de apoptose e estresse oxidativo.

8. Referências

- ALDRICH, J.F.; LOWE, D.B.; SHEARER, M.H.; WINN, R.E.; JUMPER, C.A.; KENNEDY, R.C. Vaccines and immunotherapeutics for the treatment of malignant disease. **Clinical and Developmental Immunology**, 697158, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2015. Atlanta: **American Cancer Society**, 2015.
- AMIRKHAH, R.; KHANAHMAD, H.; ABOLHASSANI, M.; POOYA, M.; MOVASSAGH, H.; SHOKRGOZAR, M.A. Improvement of bladder cancer immunotherapy by creating a recombinant Bacille Calmette-Gu'erin which secretes p53 protein. **Medical Hypotheses**, v. 72, p. 754, 2009.
- ARMITIGE, L.Y.; JAGANNATH, C.; WANGER, A.R.; NORRIS, S.J. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, p.767–778, 2000.
- BANGMA, C.H.; LOEB, S.; BUSSTRA, M.; ZHU, X.; EL BOUAZZAOU, S.; REFOS, J.; VAN DER KEUR, K.A.; TJIN, S.; KRANKEN, C.G.; VAN LEENDERS, G.J.; ZWARTHOF, E.C.; ROOBOL, M.J. Outcomes of a bladder cancer screening program using home hematuria testing and molecular markers. **European Urology**, v.64, p.41–47, 2013.
- BADJUK, M.; OOSTERLINCK, W.; SYLVESTER, R.; KAASINEN, E.; BOHLE, A.; PALOU-REDORTA, J.; MORGAN, R.; EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. **European Urology**, v.59, p.997-1008, 2011.
- BADJUK, M.; BURGER, M.; ZIGEUNER, R.; SHARIAT, S.F.; VAN RHIJN BW, COMPÉRAT, SYLVESTER, R.J.; KAASINEN, O.; BÖHLE, A.; REDORTA, J.P.; ROUPRÊT, M. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Update 2013. **European Urology**, v.64, p.639-53, 2013.
- BEGNINI, K.R.; BUSS, J.H.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Recombinant *Mycobacterium covis* BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2015.
- BEGNINI, K.R.; RIZZI, C.; CAMPOS, V.F.; BORSUK, S.; SCHULTZE, E.; YURGEL, V.C.; NEDEL, F.; DELLAGOSTIN, O.A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p. 1545-53, 2013.
- BELISLE, J.T.; VISSA, V.D.; SIEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, v.276, p.1420–1422, 1997.
- BEVERS, R.F.; KURTH, K.H.; SCHAMHART, D.H. Role of urothelial cells in BCG

immunotherapy for superficial bladder cancer. **British Journal of Cancer**, v.91, p. 607-612, 2004.

BIOT, C.; RENTSCH, C.A.; GSPONER, J.R.; BIRKHÄUSER, F.D.; JUSFORGUES-SAKLANI, H.; LEMAÎTRE, F.; PEDUTO, L.; THALMANN, G.N.; ALBERT, M.L. Preexisting BCG-specific T cells improve intravesical immunotherapy for bladder cancer. **Science Translational Medicine**, v. 4, p.137-72, 2012.

BORSUK, S.; MENDUB, T.A.; FAGUNDES, M.Q.; MICHELON, M.; CUNHA, C.W.; MCFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O.A. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis**, v.87, p.474–480, 2007.

BOTTEMAN, M.F.; PASHOS, C.L.; REDAELLI, A.; LASKIN, B.; HAUSER, R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. **Pharmacoeconomics**, v. 21, p.1315–1330, 2003.

BRAUSI, M.; ODDENS, J.; SYLVESTER, R.; BONO, A.; VAN DE BEEK, C.; VAN ANDEL, G.; GONTERO, P.; TURKERI, C.; MARREAUD, S.; COLLETTE, S.; OOSTERLINCK, W. Side effects of Bacillus Calmette–Guérin (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genito-urinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. **European Urology**, v. 65, p.69–76, 2014.

BRAUSI MA. Challenging the EAU guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC): single instillation of chemotherapy after transurethral resection of NMIBC and chemotherapy versus bacillus Calmette-Guérin in the treatment of intermediate risk tumors. **European Urology**, v. 9, p.406–410, 2010.

CATALDI, A.A.; BIGI, F.; MODH-NOR, N.; SARMIENTO, M.E; ACOSTA, A. Strategies for new Generation Vaccine Development. **The Art & Science of Tuberculosis Vaccine Development**. 2010

CLARK, P.E.; AGARWAL, N.; BIAGIOLI, M.C.; EISENBERGER, M.A.; GREENBERG, R.E.; HERR, H.W.; INMAN, B.A.; KUBAN, D.A.; KUZEL, T.M.; LELE, S.M.; MICHALSKI, J.; PAGLIARO, L.C.; PAL, S.K.; PATTERSON, A.; PLIMACK, E.R.; POHAR, L.C.; RICHIE, J.P.; SEXTON, W.J.; SHIPLEY, E.R.; SMALL, E.J.; SPIESS, P.E.; TRUMP, D.L.; WILE, G.; WILSON, T.G.; DWYER, M.; HO, M. and the National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Bladder cancer. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v.11, p.446–75, 2013.

DE REIJK, T.M.; VOS, P.C.N.; BOER, E.C.; BEVERS, R.F.M.; MUINCKEIZER, W.H.; KURTH, K.H.; SCHAMHART, D.H.J. Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guérin (BCG). **Urological Research**, v.21, p. 349–352, 1993.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature reviews**. V. 4., P. 11-22, 2004.

DORHOI, A.; REECE, S.T.; KAUFMANN, S.H. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. **Immunology Review**, v. 240, p. 235-51, 2011.

DYRSKJ, T. L.; ZIEGER, K.; REAL, F.X.; MALATS, N.; CARRATO, A. Gene expression signature predict outcome in non-muscle-invasive bladder carcinoma: a multicenter validation study. **Clinical Cancer Research**, V.13, p.3545-3551, 2007.

EL-DEMIRY, M. I.; SMITH, G.; RITCHIE, A.W.S.; JAMES, K.; CUMMING, J.A.; HARGREAVE, T.B.; CHISHOLM, G.D. Local immune responses after intravesical BCG treatment for carcinoma in situ. **British Journal of Urology**, v.60, p. 543–548, 1987.

ESUVARANATHAN, K.; ALEXANDROFF, A.B.; MCLNTYRE, M.; JACKSON, A.M.; PRESCOTT,S.; CHISHOLM, G.D.; JAMES,K. Interleukin-6 production by bladder tumors is upregulated by BCG immunotherapy. **Journal of Urology**, V.154, p. 572–575, 1995.

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

HERR, H.W. Chemoprevention of premalignant and early malignant lesions of the bladder. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.50, p.111, 1992

HERR, H.W and MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v.179, p.53-56, 2007.

HORWITZ, M.A.; LEE, B.W.; DILLON, B.J.; HARTH, G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p. 1530–1534, 1995

HOUGHTON, B.B.; CHALASANI, V.; HAYNE, D.; GRIMISON, P.; BROWN, C.S.; PATEL, M.I.; DAVIS, I.D.; STOCKLER, M.R. Intravesical chemotherapy plus bacille Calmette-Guérin in non-muscle invasive bladder cancer: A systematic review with meta-analysis. **British Journal of Urology**, v. 111, p. 977-83, 2003.

HUANG, G.; REDELMAN-SIDI, G.; ROSEN, N.; GLICKMAN, M.;JIANG, X .Inhibition of mycobacterial infection by the tumor suppressor PTEN. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 23196–23202, 2012.

HUDSON, M. A.; BROWN, E. J.; RITCHEY, J. K.; RATLIFF, T. L. Modulation of fibronectin-mediated Bacillus Calmette-Guerin attachment to murine bladder mucosa by drugs influencing the coagulation pathways. **Cancer Research**, v.51, p.3726–3732, 1991.

INCA – Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Acessado em 30 de julho de 2016.Disponível em <http://www.inca.gov.br/>

JACKSON, A. M.; ALEXANDROFF, G.N.; MCINTYRE, M.; ESUVARANATHAN, K.; JAMES, K.; CHISHOLM, G.D. Induction of ICAM 1 expression on bladder tumours by BCG immunotherapy. **Journal of Clinical Pathology**, v.47, p.309–312, 1994.

JAGANNATH, S.; DURIE, B.G.; WOLF, J.L.; CAMACHO, E.S.; IRWIN, D.; LUTZKY, J.; MCKINLEY, M.; POTTS, P.; GABAYAN, A.E.; MAZUMDER, A.; CROWLEY, J. VESCIO, R. Extended follow-up of a phase 2 trial of bortezomib alone and in combination with dexamethasone for the frontline treatment of multiple myeloma. **British Journal of Hematology**, v.146, p.619-26, 2009.

JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E. Cancer statistics, 2010. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, p.277-300, 2010.

KAMAT, A.M.; HAHN, N.M.; EFSTATHIOU, J.A.; LERNER, S.P.; MALMSTRÖM, P.U.; CHOI, W.; GUO, C.C.; LOTAN, Y.; KASSOUF, W. Bladder cancer. **The lancet.**, 2016.

KAPLAN, A. LEDFORD, D.; ASHBY, W.; CANVIN, J.; ZAZZALI, J.L.; CONNER, E.; VEITH, J.; KAMATH, N.; STAUBACH, P.; JAKOB, T.; STIRLINH, R.G.; KUNA, P.; BERGER, W.; MAURER, M.; ROSÉN, K. Omalizumab in patients with symptomatic chronic idiopathic/spontaneous urticaria despite standard combination therapy. **The journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2013

KELLEY, D. R.; RATLIFF, T.L.; CATALONA, W.J.; SHAPIRO, A.; LAGE, J.M.; BAUER, W.C.; HAAFF, E.O.; DRESNER, S.M. Intravesical bacillus Calmette- Guerin therapy for superficial bladder cancer: effect of bacillus Calmette-Guerin viability on treatment results. **Journal of Urology**, v.134, p.48–53,1985.

KIM, J. Immune checkpoint blockade therapy for bladder cancer treatment. **Investigative and Clinical Urology**. v.57, p. 98-105, 2016.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G.; VAN CREVEL, R. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 405310, 2011.

LAUDANO, M.; BARLOW, L.; MURPHY, A.; PETRYLAK, D.; DESAI, M.; BENSON, M.; MCKIERNAN, J.M. Long-term clinical outcomes of a phase I trial of intravesical docetaxel in the management of non-muscle-invasive bladder cancer refractory to standard intravesical therapy. **Urology**, v.75, p.134–137, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LUDWIG, A.T.; MOORE, J.M.; LUO, Y.; CHEN, X.; SALTSGAVER, N.A.; O'DONNELL, M.A.; GRIFFITH, T.S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guerin-induced antitumor activity. **Cancer Research**, v. 64, p. 3386-3390, 2004

MALMSTROM, P.U.; REN, Z.P.; SHERIF, A.; TORRE, M.; WESTER, K.; THORN, M. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. **Journal of Urology**, v.168, p.2240 – 44. 2002.

MCAVENEY, K. M.; GOMELLA, L. G.; LATTIME, E. C. Induction of TH1- and TH2-associated cytokine mRNA in mouse bladder following intravesical growth of the murine bladder tumor MB49 and BCG immunotherapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.39, p.401–406, 1994.

MCMURRAY, D.N. Do new TB vaccines have a place in the Expanded Program on Immunization? **Expert Review Vaccines**, v.10, p.1675–1677, 2011

MÉDERLÉ, I.; BOURGUIN, I.; ENSERQUEIX, D.; BADELL, E.; MONIZ-PEREIRA, J.; GICQUEL, B.; WINTER, N. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. **Infection and immunity**, v. 70, p.303-14, 2002.

MOCH, H.; HUMPHREY, P.A.; ULBRIGHT, T.M.; REUTER, V.E. Tumours of the urinary tract. In: World Health Organization classification of tumours of the urinary system and male genital organs. **IARC Press**, e.4, p.77–133, 2016.

MORALES, A.; COHEN, Z. *Mycobacterium phlei* cell wall- nucleic acid complex in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer unresponsive to bacillus Calmette-Guerin, **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.16, p.273-283, 2016.

MORALES E.D.; BRUCE, A.W. Intracavitary bacillus Calmette- Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. **Journal of Urology**, v.116, p.180–183, 1976

MORTON, D.; EILBER, F. R.; MALMGREN, R. A.; WOOD, W. C. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. **Surgery**, v.68, p.158–163, 1970.

MUSTAFA, A.S.; AMOUDY, H.A.; WIKER, H.G.; ABAL, A.T.; RAVN, P.; OFTUNG, F.; ANDERSEN, P. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 48, p. 535–543, 1998.

NAG, S.; ZHANG, X.; SRIVENUGOPAL, K.S.; WANG, M.H.; WANG,W.; ZHANG, R. Targeting MDM2-p53 Interaction for Cancer Therapy: Are We There Yet? **Current Medicinal Chemistry**, v.21, p.553 - 574, 2016.

OLD, L.J.; CLARKE, D.A.; BENACERRAF, B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. **Nature**, v. 184, p. 291-292, 1959.

PATEL, S.; COHEN, A.; WEINER, A.; STEINBERG, G. Intravesical therapy for bladder cancer. **Expert Opinion in Pharmacotherapy** 16: 889–901, 2015.

PEARL, R. Cancer and tuberculosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 9, p. 97-102, 1929.

PRESCOTT, S.; JAMES, K.; BUSUTTIL, A.; HARGRAVE, T.B.; CHISHOLM, G.D.; SMYTH, J.F. HLA-DR Expression by high grade superficial bladder cancer created with BCG. **British Journal of Urology** ,v. 63, p.264-269, 1989.

PREVOST-BLONDEL, A.; ROTH, E.; ROSENTHAL, F.M.; PIRCHER, H. Crucial role of TNF-alpha in CD8 T cell-mediated elimination of 3LL-A9 Lewis lung carcinoma cells in vivo. **Journal of Immunology**, v.164, p.3645-3651, 2000.

PRZYBOJEWSKA, B.; JAGIELLO, A.; JALMUZNA, P. H-RAS, K-RAS and N-RAS gene activation in human bladder cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.121, p. 73 – 7, 2000.

RATLIFF, T. L.; PALMER, J. O.; MCGARR, J. A.; BROWN, E. J. Intravesical Bacillus Calmette- Guerin therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin- mediated attachment of Bacillus Calmette- Guerin. **Cancer Research**, v.47, p.1762–1766 ,1987.

REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M.S.; BOCHNER, B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. **Nature Reviews Urology**, v.11, p.153–162, 2014.

REDELMAN-SIDI, G.; IYER, G.; SOLIT, D. B.; GLICKMAN, M. S. Oncogenic activation of Pak1- dependent pathway of macropinocytosis determines BCG entry into bladder cancer cells. **Cancer Research**, v. 73, p. 1156–1167, 2013.

RIZZI, C.; , BIANCO, M.V.; , BLANCO, F.C.; SORIA, M.; GRAVISACO, M.J.; MONTENEGRO, V.; VAGNONI, L.; BRYCE BUDDLE, B.; GARBACCIO, S.; DELGADO, F.; LEAL, K.S.; CATALDI, A.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; BIGI, F. Vaccination with a BCG Strain Overexpressing Ag85B Protects Cattle against Mycobacterium bovis Challenge. **PLoS ONE**, V. 12, 2012.

SAMPSON, S.L.; MANSFIELD, K.G.; CARVILLE, A.; MAGEE, D.M.; QUITUGUA, T.; HOWERTH; E.W.; BLOOM, B.R.; HONDALUS, M.K. Extended safety and efficacy studies of a live attenuated double leucine and pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis as a vaccine candidate. **Vaccine**, v. 29, p.4839–4847, 2011.

SAGNAK, L.; ERSOY, H.; OZOK,U.; SENTURK, B.; ERCIL, H.; BAHAR, G.; OZTURK, E. Predictive value of urinary interleukin-8 cutoff point for recurrences after transurethral resection plus induction bacillus Calmette-Guerin treatment in non-muscle- invasive bladder tumors. **Clinical Genitourinary Cancer.**, v.7, p.E16–E23, 2009.

SAINT, F.; PATARD, J.J.; MAILLE, P.; SOYEUX, P.; HOZNEK, A.; SALOMON, L.; ABOU, C.C.; CHOPIN, D.K. Prognostic value of a T helper 1 urinary cytokine response after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. **Journal of Urology**, v. 167, p. 364–367, 2002.

SCHNEIDER, B.; THANHÄUSER,A.; JOCHAM, D.; LOPPNOW,H.; VOLLMER,E.; GALLE,J.; FLAD, H.D.; ULMER, A.J.; BOHLE, A. Specific binding of bacillus Calmette-Guerin to urothelial tumor cells in vitro. **World Journal of Urology**,v.12,p. 337–344 ,1994.

SHANG, P. F.; KWONG, J.; WANG, Z.P.; TIAN, J.; JIANG, L.; YANG, K.; YUE, Z.J.; TIAN, J.Q. Intravesical Bacillus Calmette- Guerin versus epirubicin for Ta and T1 bladder cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Art. No.: CD006885.

SHENG, W.Y.; HUANG, L. Cancer immunotherapy and nanomedicine. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 200-214, 2011.

SHINNICK, T.M. Molecular biology of Mycobacterium tuberculosis. **Mycobacteria: I Basic Aspects 1**. Hardcover, 1997.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D; JEMAL,A. Cancer statistics, 2015. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11–30, 2015.

SIEVERT, K.D.; AMEND, B.; NAGELE, U.; SCHILLING, D.; BEDKE, J.; HORSTMANN, M.; HENNENLOTTER, J.; KRUCK, S.; STENZ,A. Economic aspects of bladder cancer: What are the benefits and costs? **World Journal of Urology**,v.27, p.295-300, 2009.

SONODA, T.; SUGIMURA, K.; IKEMOTO, S.; KAWASHIMA, H.; NAKATANI, T. Significance of target cell infection and natural killer cells in the anti-tumor effects of bacillus Calmette-Guerin in murine bladder cancer. **Oncology Reports**, v.17, p.1469–1474, 2007.

TULLIUS, M.V.H.; HORWITZ, M.A. New generation BCG vaccines. In: Replicating vaccines, Advances in infectious diseases. **Springer, Basel**, 2011.

WANG, R.; SUN, P.D. Natural Killer Cell-Mediated Shedding of ULBP2. **PLoS ONE**. 9(3): e. 91133.

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

WATANABE, E.; MATSUYAMA, H.; MATSUDA, K.; OHMI, C.; TEI, Y.; YOSHIHIRO, S. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 52, p. 481-6, 2003.

WIKER, H.G.; HARBOE, M. The antigen 85 complex: a major secretion product of Mycobacterium tuberculosis. **Microbiology Review**, v.56, p.648–661, 1992.

WITJES, J.A. What is the optimal BCG dose in non-muscle-invasive bladder cancer? **European Urology**, v. 52, p.1300–1302, 2007.

WU, X.R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 713-725, 2005.

YATES, D.R.; ROUPRET, M. Contemporary management of patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer who fail intravesical BCG therapy. **World journal of urology**., v. 29, p.415-22, 2011.

XU, Y.; LIU, W.; SHEN, H.; YAN, J.; QU, D.; WANG, H. (2009) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6

enhances the Th1 cell-mediated response. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, p.1121–1126, 2013.

ZBAR, B.; BERNSTEIN, I. D.; BARTLETT, G. L.; HANNA, M. G. JR; RAPP, H. J. Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastases after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. **J. National Cancer Institute**, v. 49, p.119–130, 1972.

ZBAR, B.; TANAKA, T. Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. **Science**, v.172, p.271–273, 1971.

ZBAR, B.; RAPP, H. J. Immunotherapy of guinea pig cancer with BCG. **Cancer**, v. 34, p.1532–1540, 1974.

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

ZHANG, G. J.; CRIST, S.A.; MCKERROW, A.K.; XU, Y.; LADEHOFF, D.C.; SEE, W.A. Autocrine IL-6 production by human transitional carcinoma cells upregulates expression of the alpha5beta1 fibronectin receptor. **Journal of Urology**, v. 163 ,p.1553–1559, 1999.

ZHAO, W.; SCHOREY, J.; BONG-MASTEK, M.; RITCHEY, J.; BROWN, E.; RATLIFF, T. Role of a bacillus Calmette–Guérin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. **International Journal of Cancer**, v.86, p.83–88, 2000.