

Atividade antiproliferativa de cepas de *Mycobacterium* frente à linhagem de carcinoma de bexiga

**MELO, Luiza Martins Nascentes¹; BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio¹
BEGNINI, Karine Rech¹; COLLARES, Tiago²; SEIXAS, Fabiana Komlling¹**

¹Laboratório de Genômica Funcional – CDTEC/Biotecnologia – UFPel;

²Laboratório de Embriologia e Transgênese Animal – CDTEC/Biotecnologia – UFPel;

Inascentes@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é o quarto tipo de tumor mais comum em homens e o décimo primeiro mais comum em mulheres (SIEGEL *et al.*, 2011). Possui forte impacto econômico no sistema de saúde mundial e é responsável por aproximadamente 5% de todas as mortes por câncer (SIMONS *et al.*, 2007). Segundo estatísticas nacionais, estimam-se aproximadamente 8900 novos casos de câncer na bexiga para o ano de 2012, sendo que apenas no ano de 2010 foram aproximadamente 3.167 mortes (INCA, 2012).

O *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) é uma cepa viva atenuada da bactéria *Mycobacterium bovis*. Embora tenha sido desenvolvida inicialmente para o tratamento da tuberculose, a aplicação intravesical do bacilo (BCG) é amplamente utilizada para o tratamento de câncer superficial de bexiga (MORALES *et al.*, 1976). Vários estudos têm mostrado que a parede celular micobacteriana tem um efeito tanto na estimulação do sistema imune como também matando as células cancerosas (FILION *et al.*, 2000). No entanto, o uso do BCG como agente imunoterápico pode causar alguns problemas como: efeitos colaterais, surgimento de tumores intolerantes, resistentes ou recorrentes; e quando usada a bactéria viva, o aparecimento de sintomas como febre, cistite, pneumonites e em casos mais graves sepse por BCG (LAMM *et al.*, 2009; SUTTMANN *et al.*, 2009; GONTERO *et al.*, 2010).

Algumas estratégias vem sendo desenvolvidas para a melhoria do tratamento com BCG. As mais utilizadas incluem: utilização de doses diminutas da vacina; a administração de citocinas inflamatórias em conjunto com BCG; identificação dos componentes micobacterianos responsáveis pela resposta imunológica, evitando assim a utilização do bacilo vivo; e a construção de cepas recombinantes que proporcionem maior estímulo do sistema imune e aumento do efeito antitumoral da bactéria (SCHENK-BRAAT; BANGMA, 2005; AMIRKHAH *et al.*, 2009).

Cepas recombinantes, apesar de serem uma grande estratégia para utilização em terapias com BCG, possuem problemas relacionados à utilização de antibióticos para sua seleção e clonagem, o que não é desejável em práticas clínicas (BORSUK *et al.*, 2004). Por isso, cepas auxotróficas possuem como vantagem a utilização de um sistema de seleção de recombinantes que não utiliza antibióticos. Uma cepa de *M. bovis* BCG auxotrófica para o aminoácido leucina, é caracterizada pela deleção do gene *leuD* sendo incapaz de crescer *in vitro* sem suplementação desse aminoácido. O gene *leuD* presente no plasmídeo serviu como marcador de seleção em substituição ao gene de resistência à canamicina. (BORSUK *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o objetivo do estudo foi verificar se cepas auxotróficas $\Delta leuD$ apresentam citotoxicidade frente à células de carcinoma de bexiga *in vitro*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1-Cepas bacterianas e culturas de células

Três cepas foram utilizadas neste estudo: *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, que é muito semelhante à cepa utilizada na terapia para carcinoma de bexiga; *M. bovis* Pasteur $\Delta leuD$ e *M. smegmatis* $\Delta leuD$, cepas auxotróficas para o aminoácido leucina.

As cepas foram cultivadas em Middlebrook 7H9 médio (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com glicerol 0,5%, 0,05% de Tween 80 e 10% de albumina-dextrose-catalase oleico (OADC) ou em meio sólido 7H10 Middlebrook (Difco Laboratories) suplementado com OADC. Quando necessário, o antibiótico canamicina foi adicionado a uma concentração final de 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Cepa *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas para clonagem e cultivadas em meio Luria-Bertani médio a 37 ° C com adição de canamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As células humanas de carcinoma de bexiga (5637) são do Banco de Células Tumorais do Grupo de Pesquisa em Oncologia da Biotecnologia CDTec/UFPEl. Elas foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina e 1% de penicilina / estreptomicina, comprado, respectivamente, de Vitrocell Embriolife (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, EUA). As células foram cultivadas a 37 ° C em uma atmosfera de 95% de ar umidificado e CO₂ a 5%. Os testes foram realizados com células e bactérias em fase *log* de crescimento e todos foram executados em triplicata.

2.2-Determinação da citotoxicidade

A viabilidade das células 5637 foi determinada por medição da redução de MTT solúvel [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-Diphe-nyltetrazolium brometo] para formazano insolúvel em água. As células foram distribuídas a uma densidade de 2 x 10⁴ células por poço num volume de 100 μL em placas de 96 poços, e cultivadas a 37 ° C numa atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h antes de serem utilizadas em ensaio de viabilidade celular. As células foram então incubadas com cepas BCG e *M. smegmatis* $\Delta leuD$, a uma concentração de 4,8x10⁶ CFU durante 48 horas. Após períodos de incubação os meios foram removidos e subsequentemente 180 μL de meio e 20 μL de MTT (5 mg solução de MTT / mL) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas durante um adicional de 2 h e o meio foi descartado. Um volume de 200 μL de DMSO foi adicionado a cada poço, e o formazano foi solubilizado em um agitador durante 15 min a 150 rpm. A absorbância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 492 nm. A inibição do crescimento celular foi determinada deste modo: inibição do crescimento = (1- ABS 492 células tratadas/ ABS 492 células controle) x 100%. Todas as observações foram validadas em três experimentos independentes, em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A citotoxicidade de cada cepa foi determinada com sucesso. A cepa de *M. smegmatis* Δ leuD se mostrou a cepa mais eficiente para o tratamento de carcinoma de bexiga inibindo a proliferação celular em 60%. A cepa menos eficiente foi *M. bovis* Pasteur Δ leuD que mostrou inibição de aproximadamente 35%.

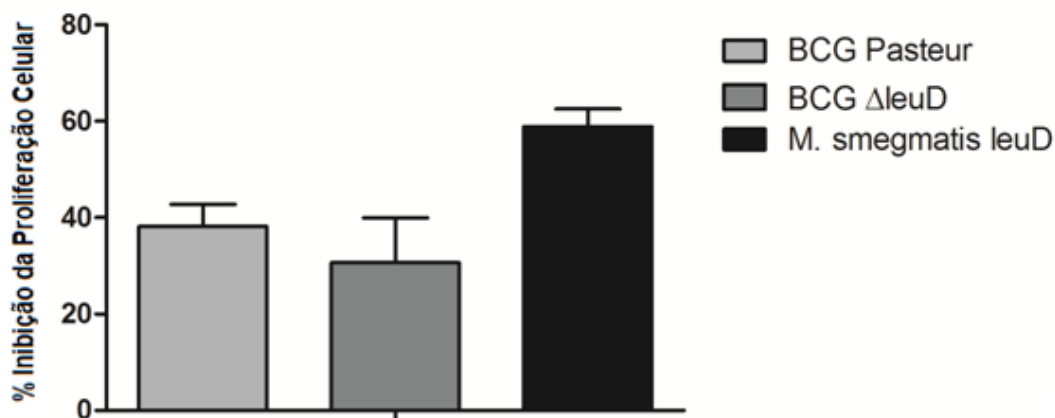


Figura 1: Gráfico em Porcentagem da Inibição da Proliferação Celular de Carcinoma de Bexiga perante as cepas: BCG Pasteur, BCG Pasteur Δ leuD, *M. smegmatis* Δ leuD

A cepa de *M. smegmatis* também se mostrou mais eficiente em estudos realizados por Keshin *et al.*(2004) *in vivo*, no qual frações ricas da parede celular causaram a ativação do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 12 (IL-12) pois o extrato da parede celular destas bactérias aumentaram os estímulos de macrófagos e monócitos melhorando conseqüentemente o seu efeito antitumoral. Também foi mostrado que, quando a IL-12 é usado localmente ou sistemicamente, tem atividade antitumoral em muitos tipos de câncer [Gillies *et al*, 1998; Izquierdo. *et al*,1996]. Em estudos realizados por Yuksel *et al.* (2011), *M. smegmatis* está entre as 88 cepas não patogênicas de *Mycobacterium* mais eficientes na liberação de citocinas. No entanto, citocinas só são liberadas em teste *in vivo* sendo necessários testes deste tipo com nossas cepas.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que cepas auxotróficas Δ leuD apresentam citotoxicidade frente às células de carcinoma de bexiga. Mais estudos são necessários, mas a cepa de *Mycobacterium smegmatis* Δ leuD pode ser um agente terapêutico mais eficaz ao câncer de bexiga do que as cepas atualmente disponíveis para imunoterapia.

5 REFERÊNCIAS

Crispen R. History of BCG and its substrains. *Prog Clin Biol Res* 1989;

310: 35–50.

van der Meijden AP, Debruyne FM, Steerenberg PA, de Jong WH.

Aspects of non-specific immunotherapy with BCG in superficial bladder cancer: an overview. *Prog Clin Biol Res* 1989; **310**: 11–33.

Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, et al. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. *Infect Immun* 2000;68:4877– 83.

Filion MC, Filion B, Reader S, et al: Modulation of interleukin-12 synthesis by DNA lacking the CpG motif and present in a mycobacterial cell wall complex. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 325–334.

Keskin MS: *M. phlei*, *M. smegmatis* : the antitumoral effects of nonpathogen mycobacteria species; diss, Hacettepe University, Ankara,2004.

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. **Med.Hypotheses**, v. 72, p. 754, 2009.

GONTERO, P.; BOHLE, A.; MALMSTROM, P.U.; O'DONNELL, M.A.; ODERDA, M.; SYLVESTER, R.; WITJES, F. The role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. **Eur.Urol.**, v. 57, p. 410-429, 2010.

INCA – Estimativa 2012, Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>, acessado em 20/07/2012.

LIU, W.; O'DONNELL, M.A.; CHEN, X. HAN, R.; LUO, Y. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing interferon-alpha 2B enhances human mononuclear cell cytotoxicity against bladder cancer cell lines *in vitro*. **Cancer Immunol.Immunother.**, 58, 1647-1655, 2009.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A.W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. **J.Urol.**, v. 116, p. 180-183, 1976.

SCHENK-BRAAT, E.A.; BANGMA, C.H. Immunotherapy for superficial bladder cancer. **Cancer Immunol.Immunother.**, v. 54, p. 414-423, 2005.

SIEGEL, R.; WARD, E.; BRAWLEY, O.; JEMAL,A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J.Clin.**, v. 61, p. 212-236, 2011.

SIMONS, M.P.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. **Immunol.Res.**, v. 39, p. 79-93, 2007.

