

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE BCG SUPEREXPRESSANDO ANTÍGENO 85B FRENTE À LINHAGEM DE CARCINOMA DE BEXIGA (5637)

BEGNINI, Karine Rech^{1*}; RIZZI, Caroline²; NEDEL, Fernanda¹; DELLAGOSTIN, Odir²; COLLARES, Tiago¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling^{1}**

¹Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Genômica Funcional, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

²Universidade Federal de Pelotas, Laboratório de Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

*begnini.k@gmail.com; **seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é um tumor maligno que se desenvolve no trato urinário e cresce a partir do revestimento interno do órgão, se propagando para o interior da cavidade. Três por cento de todos os tumores malignos são carcinomas de bexiga, constituindo o quarto tipo de tumor mais freqüente em homens e o oitavo mais freqüente em mulheres (AMIRKHAH *et al.*, 2009). Esta forma de neoplasia é muito agressiva e apresenta alto risco de progressão e óbito, sendo o sexto tumor em número de mortes nos Estados Unidos. Pacientes que apresentam carcinomas superficiais da bexiga são geralmente tratados por ressecção transuretral de diagnóstico (TUR) e controle local da carcinogênese com imunoterapia intravesical subsequente (GONTERO *et al.*, 2010). Após a ressecção transuretral, a imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (BCG) é considerada o tratamento adjuvante de escolha, visando a eliminação residual do tumor e reduzindo o risco de possíveis recidivas e progressões da doença. Aprovada em 1990 pela FDA, a imunoterapia com instilação intravesical de Bacilo Calmette-Guérin (BCG intravesical) constitui um imunoterápico padronizado para utilização em tumores não invasivos de bexiga, sendo considerado padrão ouro para carcinomas *in situ* (AMIRKHAH *et al.*, 2009).

A imunoterapia com BCG geralmente seja bem tolerada pelo paciente, porém em alguns casos algumas complicações podem ocorrer. A ocorrência de febre baixa e cistite leve após a instilação intravesical são comuns, e até consideradas como sinal de bom resultado do tratamento (JAGANNATH *et al.*, 2010). Podem ocorrer, entretanto, diversas complicações como febre alta, pneumonite, reações alérgicas, obstrução ureteral, bexiga contraída, e, em casos mais graves, sepse por BCG. Alguns pacientes são intolerantes ao BCG, e cerca de 30% destes interrompem o tratamento por causa dos efeitos colaterais (KRESOWIK & GRIFFITH, 2009).

O sucesso do BCG como agente imunoterápico vem promovendo o desenvolvimento de pesquisas que buscam maneiras de manter ou melhorar sua eficácia terapêutica, porém reduzindo o perfil de efeitos colaterais (ANDRADE *et al.*, 2009). Com este intuito, técnicas de transferência gênica podem fornecer novas estratégias terapêuticas para uma variedade de doenças. Carcinomas de bexiga parecem ser alvos ideais para utilização de terapia gênica *in situ*, principalmente devido à rapidez e segurança em sua aplicação (INOUE *et al.*, 2006). Efeitos inibitórios no crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* de diversos tipos

de cânceres, incluindo o de bexiga, vêm sendo demonstrados através da utilização de terapia gênica (MIYAKE *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2006).

O complexo AG85, composto pelas proteínas Ag85A, Ag85B e Ag85C, é o principal antígeno compartilhado pelas cepas de BCG e *M. tuberculosis*. Estes antígenos são capazes de conferir proteção contra tuberculose em modelos animais e estão associados à infectividade da bactéria (MUSTAFA *et al.*, 1998). Por serem antígenos superexpressos, existem evidências de que são capazes de aumentar a geração de peptídeos a partir do complexo AG85, bem como seus carregamentos subsequentes para as moléculas de MHC II, desencadeando processos imunológicos eficientes que podem levar a apoptose (JAGANNATH *et al.*, 2010).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar se há aumento na eficiência da imunoterapia para câncer superficial de bexiga quando da utilização de cepas de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium smegmatis* recombinantes para a proteína Antígeno 85B.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *M. bovis* $\Delta leuD$ e de *M. smegmatis* foram cultivadas em meio 7H9 Middlebrook (Difco) suplementado com 10% de OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex), 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80. Quando necessário, as cepas bacterianas foram cultivadas com suplementação de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do aminoácido L-leucina, bem como com os antibióticos canamicina a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para *E. coli*) e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para micobactéria). O DNA genômico de *M. bovis* foi extraído de uma linhagem patogênica local e a confirmação da identidade do DNA genômico extraído foi realizada através da detecção da seqüência de inserção (IS) 6110 por PCR. As seqüências dos genes alvos selecionados foram amplificadas através da técnica de PCR, utilizando-se a enzima Go TAq® Hot Start Polymerase Sample (Promega), para posterior clonagem nos vetores pAE para obtenção das frações recombinantes da proteína Ag85B, e nos vetores pUP410 e pUS2000 para construção de BCG recombinante expressando Ag85B. Os *primers* foram desenhados a partir da seqüência depositada no GenBank sob o número de acesso NC_002945, derivada do seqüenciamento de *M. bovis* AF2122/97, com o auxílio do programa *Vector NTI 10.0* (Invitrogen). Todas as células transformadas foram selecionadas em meio seletivo (meio 7H10 contendo 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina ou desprovido de L-leucina) e cultivadas em meio líquido para avaliação da expressão da proteína recombinante. A confirmação da presença das proteínas recombinantes no citoplasma celular e sobrenadante da cultura micobacteriana foi demonstrada utilizando-se *Western blot*.

Foram utilizados os cultivos em meio líquido de BCG Pasteur $\Delta leuD$ para preparação das vacinas. A cultura bacteriana foi centrifugada e o pellet ressuspendido em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Um volume de 10 μL desta suspensão, em uma concentração de 2×10^6 UFC mL^{-1} , foi utilizado para inoculação das placas contendo a linhagem celular de carcinoma humano de bexiga 5637. Foram realizadas co-culturas da linhagem tumoral com a cepa de BCG superexpressando Ag85B ($\Delta leuD$ /Ag85B), bem como com os respectivos controles ($\Delta leuD$ e $\Delta leuD$ /PUP). O efeito das cepas bacterianas sobre o crescimento *in vitro* da linhagem de carcinoma humano de bexiga 5637 foi avaliado através da técnica colorimétrica utilizando MTT (Sigma®). Diferenças nos

valores de absorvância determinarão a porcentagem de células vivas, através de leitura de densidade óptica a 492 nm. A inibição do crescimento celular foi determinada da seguinte forma: Inibição do Crescimento = $(1 - \frac{Abs_{492\text{treated cells}}}{Abs_{492\text{control cells}}}) \times 100\%$. Para cada uma das cepas o crescimento foi validado em três experimentos independentes, em triplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise da atividade antiproliferativa das cepas de BCG, frente à linhagem de carcinoma humano de bexiga, mostrou que a cepa BCG Pasteur $\Delta leuD/Ag85B$ possui maior potencial de inibição do crescimento tumoral (68,73%), conforme ilustrado na Figura 1.

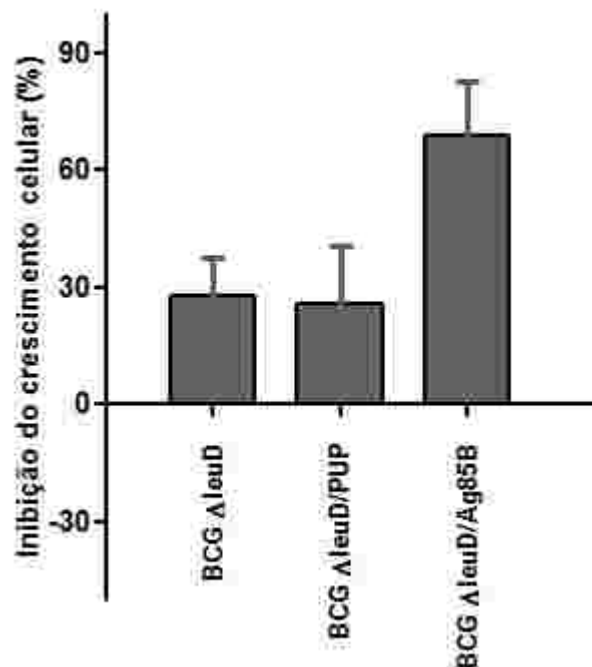


Figura 1: Porcentagem de inibição do crescimento celular da linhagem tumoral 5637 (carcinoma superficial de bexiga) quando expostas a diferentes cepas de *Mycobacterium*.

Neste trabalho se investigou pela primeira vez o potencial antiproliferativo de micobactérias superexpressando Ag85B frente à linhagem de carcinoma humano de bexiga *in vitro*. O antígeno Ag85B é uma proteína altamente imunogênica capaz de induzir fortes respostas imunes do tipo Th1 (SHEIKH *et al.*, 2011). Além disso, está relacionada ao potencial de infectividade da bactéria, sendo capaz de aumentar a geração de peptídeos a partir do complexo AG85, desencadeando processos de apoptose celular (JAGANNATH *et al.*, 2010). Tais eventos podem estar relacionados a melhorias na taxa de inibição do desenvolvimento tumoral apresentadas pelas cepas que superexpressam Ag85B. No entanto, mais estudos a cerca desses dados se fazem necessários para confirmação do potencial imunoterapêutico e apoptótico dessas cepas de micobactérias

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que cepas de BCG superexpressando Ag85B possuem potencial antiproliferativo superior à cepa controle atualmente utilizada para imunoterapia de câncer superficial de bexiga, revelando a necessidade de realização de novos estudos para comprovação de sua eficácia em imunoterapias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRKHAH, R.; KHANAHMAD, H.; SHOKRGOZAR, M.A. Improvement of bladder cancer immunotherapy by creating a recombinant Bacille Calmette-Guerin which secretes p53 protein. **Medical Hypotheses**, n. 72, p. 753–761, 2009.

ANDRADE, P.M.; CHADE, D.C.; BORRA, R.C.; NASCIMENTO, I.P.; VILLANOVA, F.E.; LEITE, L.C.C.; ANDRADE, E.; SROUGI, M. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 2009. doi:10.1016/j.urolonc.2008.12.017

GONTERO, P.; BOHLE, A.; MALMSTROM, P.U.; O'DONNELL, M.A.; ODERDA, M.; SYLVESTER, R.; WITJES, F. The role of Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. **European Urology** n. 57, p.410-429, 2010.

INOUE, M.; TOMIZAWA, K.; MATSUSHITA, M.; LU Y-F.; YOKOYAMA, T.; YANAI, H.; TAKASHIMA, A. KUMON, H.; MATSUI, H. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. **European Urology**, n. 49, p. 161–168, 2006.

JAGANNATH, C.; LINDSEY, D.R.; DHANDAYUTHAPANI, S.; XU, Y.; HUNTER, R.L.; EISSA, N.T. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p.267-276, 2009.

KRESOWIK, T.P.; GRIFFITH, T. Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. **Immunotherapy**, v. 1, n.2, p. 281-288, 2009.

MIYAKE, H.; YAMANAKAY, K.; MURAMAKI M.Y.; HARAY, I.; GLEAVEZ, M.E. Therapeutic efficacy of adenoviral-mediated p53 Gene transfer is synergistically enhanced by combined use of antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. **Neoplasia**, n. 7, vol. 2, p. 171– 179, 2005.

MUSTAFA AS, AMOUDY HA, WIKER HG, ABAL AT, RAVN P, OFTUNG F. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand J Immunol**; n. 48, p. 535-43; 1998.

RICHARD C, LOCKYER W, GILLATT DA. BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. **Journal of Royal Society of Medicine**, n. 94, p.119–23, 2001.

SHEIKH, J.A.; KHULLER, G.K.; VERMA, I. Immunotherapeutic role of Ag85B as an adjunct to antituberculous chemotherapy. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**, n. 9, v. 4, 2011.