DAHER CEZAR CHADE

**Avaliação do bacilo de Calmette-Guérin recombinante
expressando o antígeno S1PT no tratamento do carcinoma
urotelial de bexiga em modelo experimental**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Urologia
Orientador: Prof. Dr. Miguel Srougi

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Chade, Daher Cezar

Avaliação do bacilo de Calmette-Guérin recombinante expressando o antígeno
SIPT no tratamento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo experimental /
Daher Cezar Chade. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Miguel Srougi.

Descritores: 1.Neoplasias da bexiga urinária 2.Vacinas anti-câncer
3.Administração intravesical 4.*Mycobacterium bovis* 5.Imunoterapia

USP/FM/SBD-399/08

Aos meus queridos pais, Milca e Jamil, meus exemplos de vida.

À minha esposa Leticia, a inspiração da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Miguel Srougi**, um médico extraordinário, um professor dedicado, e um mestre na verdadeira concepção do termo. Desde a criação desta linha de pesquisa em tumor vesical experimental até a correção final deste texto, ele me guiou a cada passo.

Ao iniciar esse estudo, encontramos muitos obstáculos. No entanto, a **Dra. Kátia Ramos Leite** (chefe do Laboratório de Investigações Médicas da Urologia LIM-55) soube motivar a todos por meio do convívio diário no comando do grupo, sendo um exemplo de competência e dedicação, a quem agradeço muito.

Sou extremamente grato à **Dra. Priscila Maria Andrade**, que teve grande participação neste estudo e no meu aprendizado em biologia molecular e metodologia científica, sem os quais não seria possível a realização desta tese. Repasso inteiramente a ela o crédito por ter firmado as parcerias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) com o Instituto Butantan (São Paulo), Universidade de Iowa (EUA) e Universidade Ibirapuera, os quais foram fundamentais neste trabalho.

Agradeço muito o empenho do **Dr. Ricardo Carneiro Borra**, ao permitir e orientar o longo processo de criação do modelo animal de tumor vesical em seu laboratório, além do rico aprendizado em imunologia.

A **Dra. Luciana Cezar Cerqueira Leite** (chefe do Laboratório de Biotecnologia IV – Instituto Butantan, SP) foi responsável por nos conceder o uso do BCG recombinante em tumor vesical. Ela nos abriu as portas do seu laboratório para este estudo, possibilitando-nos testar de forma pioneira este novo imunoterápico e nos guiando em discussões imunológicas daí geradas. Nesse contexto, agradeço também a atuação do **Dr. Ivan Pereira Nascimento**, pesquisador do referido laboratório, e que participou ativamente em cada experimento.

Agradeço muito aos membros da **Banca de Qualificação (Profa. Dra. Gilka Gattás, Dra. Kátia Ramos Leite, Prof. Dr. Marcos F. Dall'Oglio)** pelos comentários e correções, os quais foram de grande valia na confecção do texto final.

Agradeço ao **Prof. Dr. Roger Chammass** pelo apoio, ao ceder-nos espaço no biotério do LIM-24.

Sou grato à **Adriana Sañudo** pela realização da estatística deste estudo, além dos ensinamentos contínuos.

Agradeço aos membros do LIM-55 pelo convívio e aprendizado que me proporcionaram, em especial à **Sabrina Thalita Reis** e à **Fabiola Elizabeth Villanova**.

Agradeço a todos os funcionários e colegas da **Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da FMUSP**.

Em especial, sou eternamente grato aos **Meus Pais (Milca e Jamil) e Irmãos (Milca e Jamil)**, que me apóiam continuamente no âmbito profissional e pessoal.

Finalmente, agradeço a **Deus** por ter permitido que eu conhecesse todas essas pessoas maravilhosas citadas e que participasse do Programa de Pós-Graduação da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Agradecimento às Instituições Participantes

1. Laboratório de Investigação Médica (LIM 55) da Divisão de Clínica Urológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
2. Laboratório de Biotecnologia Molecular IV - Instituto Butantan, São Paulo
3. Universidade Ibirapuera, São Paulo

Suporte Financeiro:

1. Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(processo 06/57821-2)
2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
(bolsa de pós-graduação *stricto sensu* nível doutorado)

Normalização adotada

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas e siglas	
Listas de Gráficos, Tabelas e Figuras	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Principal	15
2.2 Objetivos Secundários	15
3. MÉTODOS	16
3.1 Desenvolvimento do Modelo Animal de Tumor Vesical.....	18
Experimento I.....	19
3.2 Análise do Peso das Bexigas.....	20
3.3 Análise de Hematúria	21
3.4 Análise Anátomo-Patológica e Imunohistoquímica.....	21
3.5 Padrões de Resposta Imune Th1/Th2	23
3.6 Ensaio de Viabilidade: Co-cultura Esplenócito – Célula Tumoral	25
Experimento II	26
3.7 Ensaio de Sobrevida	26
Experimento III- Bexiga Sem Tumor	26
3.8 Análise Anátomo-Patológica e Padrões de Resposta Imune.....	26
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Desenvolvimento do Modelo Animal de Tumor Vesical.....	29
Experimento I.....	30
4.2 Análise do Peso das Bexigas.....	30
4.3 Análise de Hematúria	31
4.4 Análise Anátomo-Patológica e Imunohistoquímica.....	33
4.5 Padrões de Resposta Imune Th1/Th2	34
4.6 Ensaio de Viabilidade: Co-cultura Esplenócito – Célula Tumoral	36

Experimento II	36
4.7 Ensaio de Sobrevida	36
Experimento III – Bexiga sem tumor	38
4.8 Análise Anátomo-Patológica e Padrões de Resposta Imune.....	38
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	48
7. ANEXOS	51
8.1 ANEXO A: Protocolo da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP	52
8.2 ANEXO B: Primers.....	53
8.3 ANEXO C: Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT- PCR) em tempo real	54
8. REFERÊNCIAS	56

Apêndice

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BAK	Células de Defesa Ativadas por BCG
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CEA	Antígeno Cárcino-Embrionário
CFU	Unidades formadoras de colônias
CK7	Citoqueratina 7
EUA	Estados Unidos da América
<i>et al.</i>	e colaboradores
FANFT	N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamida
FDA	Órgão americano regulador do uso de medicamentos e alimentos
Fig.	Figura
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase
g	gramas
h	Hora
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDH	Lactato desidrogenase

mg	Miligrama
MHC-II	Complexo maior de histocompatibilidade - classe II
ml	Mililitro
N	Número de animais da amostra
NCI	Instituto Nacional do Cancer (EUA)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pBlaF*	Promotor da β -lactamase de <i>M. fortuitum</i>
PPD	Derivado Protéico Purificado
<i>PT</i>	Toxina <i>pertussis</i>
rBCG-S1PT	BCG recombinante expressando o antígeno S1PT
RNA _m	Ácido Ribonucléico (RNA) mensageiro
<i>RT-PCR</i>	Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa
S1PT	Subunidade 1 da Toxina <i>pertussis</i>
SF	Soro Fisiológico 0,9%
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 – Média e desvio padrão dos pesos vesicais dos camundongos com tumor urotelial ortotópico MB49 (em mg).....	31
Gráfico 2 – Aparecimento de hematúria macroscópica nos animais com tumor tratados com SF, BCG ou rBCG-S1PT	32
Gráfico 3 – Expressão gênica relativa (GAPDH), quantificada por <i>RT-PCR</i> em tempo real, referente à resposta imune Th1.....	35
Gráfico 4 – Expressão gênica relativa (GAPDH), quantificada por <i>RT-PCR</i> em tempo real, referente à resposta imune Th2	35
Gráfico 5 – Viabilidade das células tumorais MB49 em co-cultura com esplenócitos de camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF.....	36
Gráfico 6 – Curva de sobrevida dos camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF, após implante intravesical de células tumorais MB49.....	37
Gráfico 7 – Sobrevida média dos grupos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF, após implante intravesical de células tumorais MB49.....	37
Gráfico 8 – Expressão gênica relativa quantificada por <i>Real Time PCR</i> dos padrões de resposta imune Th1/Th2 dos grupos que receberam SF, BCG ou rBCG-S1PT com bexiga sem tumor.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Citocinas avaliadas conforme o padrão de resposta imune Th1/Th2	24
Tabela 2 – Análise das comparações múltiplas dos pesos vesicais entre os grupos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Cronologia esquemática das Cepas do <i>M. bovis</i> utilizadas no tratamento de câncer vesical: ano da primeira publicação, instituição e/ou local de origem.	4
Figura 2 – Construção da vacina de BCG recombinante: utilizado o vetor de expressão pLA73, o qual possui a origem de replicação de <i>E. coli</i> e micobactéria, o gene de resistência à kanamicina, pBlaF* (códon de iniciação) e o gene da sequência de sinalização da β -lactamase.....	12
Figura 3 – Instilação intravesical de 0,1 ml de suspensão de células MB49 (5×10^5 células/camundongo) após cauterização química do epitélio vesical com AgNO_3	19
Figura 4 – Bexiga acometida por tumor observado durante cistectomia.	21
Figura 5 – Aspecto macroscópico do carcinoma urotelial no camundongo, após cistectomia.	29
Figura 6 – Hematúria macroscópica observada no 8º dia após o implante tumoral das células MB49, antes da segunda instilação intravesical (BCG, rBCG-S1PT ou SF), em camundongos C57BL/6.....	32
Figura 7 – Carcinoma urotelial infiltrativo difusamente na camada muscular própria, HE, X40 (A) e lâmina própria, HE, X400 (B). Carcinoma de alto grau, caracterizado por crescimento exofítico intravesical, HE, X40 (C). Carcinoma apresentando intenso polimorfismo nuclear e alta atividade mitótica, HE, X400 (D).	33
Figura 8 – Imunohistoquímica: carcinoma urotelial infiltrativo expressando CEA (A) e CK7 (B), X400; ausência de expressão para p53 (C) e Her2/neu (D), X400.	34
Figura 9 – Bexigas sem tumor, submetidas a tratamento intravesical com BCG (A), HE X100; rBCG-S1PT (B), HE X40; ou SF (C), HE X400.....	38

RESUMO

Chade DC. *Avaliação do bacilo de Calmette-Guérin recombinante expressando o antígeno S1PT no tratamento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 63p.

Introdução: A imunoterapia intravesical com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) é o tratamento adjuvante de escolha no câncer superficial de bexiga. Recentemente, os estudos do mecanismo imunoterápico do BCG têm permitido identificar as reações imunológicas e os genes associados ao efeito antitumoral, possibilitando a produção de vacinas recombinantes, possivelmente mais efetivas e com menos efeitos colaterais. Com esses objetivos, associou-se o componente *pertussis* (S1PT) ao BCG, criando uma variante recombinante (rBCG-S1PT) com capacidade para promover uma resposta imune direcionada ao tipo *T helper 1* (Th1), o que poderá elevar a eficácia antitumoral do imunoterápico. **Objetivo:** Avaliar comparativamente o efeito antitumoral do rBCG-S1PT e do BCG no modelo experimental de carcinoma urotelial de bexiga. **Métodos:** O estabelecimento do modelo murino ortotópico e singênico de tumor vesical foi realizado através da implantação transuretral das células tumorais de bexiga da linhagem MB49 de camundongo C57BL/6. Experimento I – Os animais (modelo experimental) foram divididos em três grupos, os quais receberam 4 aplicações semanais de rBCG-S1PT, BCG, ou soro fisiológico (grupo controle), por via intravesical. Após 7 dias da última aplicação, foram extraídos o baço e a bexiga, com o intuito de inferir o peso tumoral. Em seguida, as bexigas foram submetidas à avaliação do padrão de resposta imunológica e exame anátomo-patológico e imunohistoquímico. Experimento II – Realizado como descrito no Experimento I, porém os animais foram acompanhados por 60 dias para análise de sobrevida. Experimento III – Este ensaio foi realizado como descrito anteriormente, porém não foi realizada a implantação tumoral, para controle dos achados imunológicos e anátomo-patológicos. **Resultados:** A taxa média de implantação tumoral foi de aproximadamente 90% dos animais inoculados. Obtivemos redução das médias dos pesos vesicais dos grupos BCG e rBCG-S1PT ($p<0,001$). Nos dois grupos tratados com os imunoterápicos observou-se aumento significativo da expressão de TNF- α , a qual foi mais intensa com o uso do rBCG-S1PT ($p<0,05$). A IL-10 também teve aumento significativo de sua expressão no grupo BCG recombinante ($p<0,01$). Os esplenócitos provenientes dos camundongos que foram tratados com imunoterápicos diminuíram a viabilidade das células tumorais MB49, sendo que este efeito foi mais intenso no grupo rBCG-S1PT. O grupo de animais tratados com rBCG-S1PT apresentou aumento significativo da sobrevida em relação aos outros grupos (Experimento II). As aplicações dos imunoterápicos em animais sem tumor (experimento III) não revelaram diferenças histológicas em relação ao grupo controle e o padrão de resposta imunológica encontrado sugere uma tendência à resposta Th1. **Conclusão:** Obtivemos sucesso no estabelecimento do modelo murino ortotópico singênico de tumor vesical. O imunoterápico rBCG-S1PT apresentou mais benefícios no tratamento do tumor vesical ortotópico em camundongos em relação ao BCG, como também maior redução da viabilidade das células tumorais *in vitro*. A cepa rBCG-S1PT apresentou elevação significativamente maior das citocinas da resposta imune Th1 em relação

aos demais grupos. Concluimos, então, que os dados apresentados sugerem a possibilidade deste recombinante proporcionar melhor controle clínico do tumor vesical em humanos que a imunoterapia com BCG.

Descritores: 1.Neoplasias da bexiga urinária 2.Vacinas anti-câncer
3.Administração intravesical 4.*Mycobacterium bovis* 5.Imunoterapia

SUMMARY

Chade DC. *Evaluation of recombinant bacillus Calmette-Guérin expressing S1PT in the treatment of urothelial bladder carcinoma in an experimental model* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 63p.

Introduction: The intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the adjuvant treatment of choice in superficial bladder cancer. Recently, studies of the mechanism of BCG have identified the immune reactions favorable and the genes responsible for the antitumor effect, enabling the production of recombinant vaccines, possibly more effective and with fewer side effects. With those goals, the *pertussis* toxin (S1PT) was combined to BCG, creating a recombinant variant (rBCG-S1PT) with the capacity to promote an immune response targeted to the T helper type 1 (Th1), which may increase the effectiveness of its antitumor effect. **Objective:** Compare the antitumor effects of rBCG-S1PT and BCG in an experimental model of bladder cancer. **Methods:** The development of the animal model of bladder cancer was conducted by transurethral instillation of bladder tumor cell line MB49 of the mouse strain C57BL/6, setting the orthotopic and syngeneic murine model. Experiment I - The animal models were divided into three groups, which received 4 weekly intravesical applications of rBCG-S1PT, BCG, or saline (SF - control group). After 7 days of the last instillation, splenectomy was performed for splenocyte culture and the bladders extracted and weighed in order to infer the tumor weight. Then, the bladders were divided into two pieces. The first was used for molecular analysis to assess the pattern of immune response. The second was sent to histopathological analysis. Experiment II - Held as described in Experiment I, but the animals were monitored for 60 days for analysis of survival. Experiment III - This test was carried out as previously described (Experiment I), but with no tumor cells instillation. **Results:** The rate of tumor implantation was 90% of the animals submitted to tumor inoculation. We obtained reduction of the average weights of bladder in groups BCG and rBCG-S1PT ($p<0,001$). In both groups treated with immunotherapy, there was an increase of expression of interleukins TNF- α , which was more intense in the group treated with rBCG-S1PT ($p<0,05$). There was also increased expression of IL-10 in the recombinant BCG ($p<0,01$). The splenocytes from animals that received immunotherapies had reduced tumor cells viability, more intensely demonstrated in the rBCG-S1PT group. The analysis of survival showed a significant increase in the group of animals treated with rBCG-S1PT (Experiment II). The instillation of immunotherapeutic agents in animals without tumor did not demonstrate histological differences when compared to the control group and the immunological response pattern was similar to that of Experiment I (Experiment III). **Conclusion:** The establishment of the syngeneic orthotopic animal model was successful. The immunotherapy with rBCG-S1PT demonstrated more benefits than BCG in the treatment of bladder cancer in mice, reducing the bladder weight, increasing survival, and reducing tumor cells viability *in vitro*. The immune response obtained with the rBCG-S1PT expressed higher cytokines related to Th1. All this data may indicate that this recombinant agent may promote better bladder tumor control than BCG immunotherapy.

Descriptors: 1.Urinary Bladder Neoplasms 2.Cancer Vaccines 3.Administration, Intravesical 4.*Mycobacterium bovis* 5. Immunotherapy

1. INTRODUÇÃO

Anualmente são diagnosticados aproximadamente 330.000 novos casos de carcinoma de bexiga e 130.000 óbitos são decorrentes deste tumor, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS).¹ A neoplasia vesical tem maior prevalência em países desenvolvidos (60% dos casos), sendo a relação homem mulher de 3:1. A incidência e a mortalidade pelo tumor vesical estão relacionadas diretamente com idade, principalmente acima de 65 anos. Nos últimos anos a tendência tem sido de aumento discreto do número de casos. O tumor de bexiga não invasivo apresenta alta recorrência e progressão, com índices atingindo 69-80% de recorrência e 33-48% de progressão, nos casos de tumor pT1.²

O risco de desenvolver tumor de bexiga aumenta em 2 a 5 vezes nos tabagistas.³ Metabólitos como as aminas aromáticas parecem ser importantes neste mecanismo, como a benzidina, 4-aminobifenil, 2-naftilamina e 4-cloro-orto-toluidina.¹

A herança genética na carcinogênese vesical mostra-se fortemente associada ao surgimento do tumor. Há, porém, a necessidade de melhor elucidar os mecanismos envolvidos neste processo.⁴

Basicamente, as alterações gênicas, envolvidas na patogênese do câncer vesical, decorrem do desequilíbrio de dois eventos cruciais: inibição dos genes supressores de tumores p53, Rb e deleções no cromossomo 9; e ativação de oncogenes (c-erb-B2, HER-2/neu e H-ras), ambos os eventos relacionados com mutações induzidas pelos fatores de risco acima descritos.⁵

Cerca de 90% dos tumores vesicais são carcinomas uroteliais de bexiga. Este tumor caracteriza-se pela recorrência freqüente (69-80%) e predisposição em 33-48% para progredir como doença invasiva. Fatos estes, que podem ser explicados pela: multifocalidade do tumor, pelas altas taxas de displasia associada, pela grande disseminação intra-epitelial e possível implantação decorrente do tratamento com ressecção eletro-cirúrgica.⁶

O tratamento do câncer vesical não invasivo baseia-se na abordagem cirúrgica endoscópica, associada à terapia intravesical complementar. As instilações vesicais têm como objetivo principal promover efeito antineoplásico através da estimulação do sistema imunológico e liberação local de interleucinas.⁷

Instilações vesicais do bacilo de Calmette-Guérin (BCG), derivado do *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*), representam o tratamento adjuvante de primeira escolha no câncer não invasivo de bexiga, o qual está baseado em ação antineoplásica decorrentes da resposta imunológica celular.⁷

O uso do BCG em tumor vesical constitui um exemplo de sucesso da medicina translacional, trazendo uma vacina utilizada mundialmente na prevenção da tuberculose para o campo da oncologia. O sucesso dessa terapêutica antitumoral criou um marco na história de mais de 100 anos da imunoterapia com BCG.⁸

Em 1908, os pesquisadores Albert Calmette e Camille Guérin isolaram uma cepa virulenta do *M.bovis*, no Instituto Pasteur (Lille, França).⁸ Com a cultura desta cepa, gradualmente houve atenuação da sua virulência, sendo possível a imunização bovina em 1915. Após 231 passagens em subculturas, durante 13 anos, experimentos em suínos demonstraram que haviam criado uma cepa atenuada e estável, sendo chamada de bacilo de Calmette-Guérin (BCG).⁸

Em 1921, foi realizado o primeiro teste em humanos com a vacina por via oral. A partir de 1924, o Instituto Pasteur passou a distribuir a vacina para diversos países do mundo. Nesse período, a vacina envolvia o uso do bacilo vivo, mantido em cultura com sucessivas passagens. Nos anos subseqüentes, houve a propagação de diversas cepas por mais de 1000 passagens adicionais, até o advento da liofilização da vacina, instituída apenas em 1960.⁶ Apesar da variação fenotípica das diferentes cepas originadas nesse processo, todas mantiveram alguma eficácia e passaram a ser produzidas e nomeadas conforme o local ou o produtor. As cepas mais utilizadas em câncer vesical são a Holandesa (*Dutch*), Dinamarquesa (*Danish*), Glaxo (Evans, Reino Unido), Chicago (Tice), Montreal (Frappier), Toronto (Cannaught) e Tokyo (Figura 1).⁹

Figura 1 – Cronologia esquemática das Cepas do *M. bovis* utilizadas no tratamento de câncer vesical: ano da primeira publicação, instituição e/ou local de origem.

A relação da tuberculose com câncer foi demonstrada por Pearl em 1929, quando ele demonstrou o antagonismo entre pacientes com tuberculose e redução da incidência de neoplasias.¹⁰ Os pacientes com maior sobrevida por câncer apresentavam maiores índices de tuberculose ativa ou prévia. Dessa forma, foram descritos os efeitos protetores antitumorais da tuberculose, porém sem evidências suficientes para comprová-los.¹⁰

O uso do BCG em oncologia foi proposto concretamente após a publicação de Old et al., em 1959. Dados de estudos experimentais realizados no Sloan-Kettering Institute (Nova York, EUA) com camundongos demonstraram maior resistência à implantação tumoral nos animais tratados com BCG.¹¹

Em 1960, houve uma grande epidemia de tuberculose em crianças alemãs por BCG contaminado com *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), decorrente de um erro laboratorial, conhecido como desastre de Lubeck. Esse evento levou a uma descrença na imunização por BCG, o que também reduziu muito o interesse pelas pesquisas do BCG em neoplasias.¹²

O mecanismo de proteção do BCG contra neoplasias passou a ser compreendido quando Zbar et al.(1971) observaram um importante efeito antitumoral mediado por resposta imune do tipo hipersensibilidade tardia (tipo IV).¹³ Seus estudos demonstraram uma redução da implantação e do crescimento tumoral quando uma nova aplicação de células neoplásicas era realizada em um momento subsequente à inoculação de BCG, no mesmo sítio. Dados desses autores também evidenciaram redução da incidência de metástases nos animais tratados.¹³

O uso clínico do BCG no tratamento de pacientes oncológicos foi proposto por Mathe, na França (1969), após resultados promissores com sua utilização como terapia adjuvante para leucemia.¹⁴

Experiências iniciais envolveram uso do BCG em melanoma e o primeiro relato de aplicação transuretral de BCG foi publicado por deKernion *et al.*, em 1975, em um caso de melanoma de bexiga.¹⁵ Diversos tumores foram tratados com BCG, porém novos quimioterápicos logo demonstraram superioridade em relação à essa vacina, exceto na terapêutica local do carcinoma de bexiga.⁹

A aplicação de BCG intravesical como terapia adjuvante em carcinoma urotelial não invasivo de bexiga foi inicialmente testada com sucesso por Morales *et al.* (1976) em um pequeno grupo de pacientes, visando a redução da recorrência local.¹⁶ Foi utilizada a cepa Frappier (Montreal), na dose de 120mg em 50 ml de SF, por via transuretral. O esquema de aplicação foi de seis doses semanais, baseado no conhecimento já existente quanto à importância da resposta de hipersensibilidade tardia (tipo IV), demonstrado anteriormente por Coe e Feldman, em 1966. Dez pacientes receberam este esquema observando-se erradicação ou redução das lesões tumorais em sete deles.¹⁷

Esses dados preliminares levaram o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos a financiar dois ensaios clínicos randomizados em 1980 para avaliar o uso do BCG em tumor não invasivo de bexiga, realizados pelo Southwest Oncology Group e pelo Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.¹⁸ Ambos demonstraram resultados favoráveis e similares, justificando novos estudos com BCG para tratamento do carcinoma de bexiga. Em 1990, o FDA aprovou o uso deste imunoterápico para uso padronizado em tumor não invasivo de bexiga.⁹

Desde então, multiplicaram-se as pesquisas com BCG e diversas cepas foram desenvolvidas, todas elas com características antitumorais presentes.¹⁹ De maneira uniforme, elas apresentam eficácia no controle do tumor vesical não invasivo no curto prazo. No entanto, mantêm os efeitos colaterais, como os sintomas irritativos miccionais, o potencial de disseminação e as complicações sistêmicas, além de altos índices de recidiva tardia.¹⁹

Os efeitos colaterais decorrentes do tratamento intravesical do carcinoma urotelial com BCG representam o principal motivo de interrupção do tratamento. Os achados mais freqüentes são hematúria e sintomas miccionais irritativos, como disúria, polaciúria e urgência. As complicações potencialmente graves são raras, incluindo febre, artralgia, íleo paralítico, mielossupressão e sepsis.²⁰

O tratamento das complicações decorrentes do uso do BCG intravesical varia conforme a gravidade dos sintomas, sendo que aqueles secundários ao processo irritativo local são habitualmente auto-limitados e podem ser conduzidos com medicações sintomáticas. Deve ser considerada a suspensão do BCG quando os sintomas, tanto locais quanto sistêmicos, persistirem por mais de 48h. Pode ainda ser necessário o esquema anti-tuberculoso baseado no uso da isoniazida e rifampicina nos pacientes com sintomas persistentes, além da suspensão ou redução da dose das aplicações intravesicais do BCG.²¹

Desta forma, esquemas alternativos tem sido estudados, como o uso de Epirrubicina, Doxorubicina, Mitomicina C, Gemcitabina e Docetaxel,²²⁻²³ A Gemcitabina é um agente quimioterápico análogo da desoxicitidina que já foi testado em tumor avançado de bexiga, atingindo respostas variando de 22,5 a 28%, o que motivou pesquisá-lo em tumor não invasivo.²⁴ Em estudo fase I, Dalbagni *et al.*(2002)

avaliou pacientes com tumor vesical refratário ao BCG. Houve boa tolerabilidade da droga administrada por via transuretral, porém verificaram mielossupressão e sintomas irritativos locais no esquema considerado ideal de 2 aplicações semanais, na dose de 2.000 mg, por 3 semanas.²⁵

No estudo de fase II, os mesmos autores verificaram apenas 21% dos pacientes livres de doença um ano após o tratamento.²⁴

No entanto, a aplicação intravesical do Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) continua sendo o agente de maior eficácia na prevenção de recorrência e progressão tumoral no tumor não invasivo de bexiga e no carcinoma *in situ* (CIS) da bexiga.²⁶⁻²⁹

Recentemente, o mecanismo imunoterápico do BCG ficou melhor compreendido com a identificação dos genes responsáveis pela sua resposta antitumoral, possibilitando a produção de organismos recombinantes capazes de estimular a resposta imune através dos linfócitos *T helper 1* (Th1) de forma mais intensa, visando a diminuição da dose a ser empregada e, conseqüentemente, o aparecimento de menos efeitos colaterais.³⁰ A resposta imunológica desencadeada pelo BCG é regida, principalmente, pelas interleucinas (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e IL-18; além do IFN- γ , IFN- α 2B e TNF- α . Estas vacinas recombinantes podem ser associadas a agentes potencializadores da resposta imune Th1, tais como, inibidores da ciclooxigenase 2 (Cox-2) e quimioterápicos, com efeitos benéficos.³⁰

Estudos experimentais demonstraram que a ação antitumoral do BCG pode ser evidenciada por seis a 12 meses após a aplicação.³¹ A resposta imunológica celular é responsável por esse efeito prolongado e tardio da terapia intravesical. A resposta Th1 promove o desenvolvimento de infiltrados granulomatosos suburoteliais, que exercem papel de órgãos linfóides secundários, ativando as células

imunologicamente ativas contra as células tumorais. Linfócitos CD4⁺ representam o componente celular predominante do granuloma estabelecido, que pode durar até um ano. Estudos demonstram que a presença dos linfócitos T é necessária à resposta imune de inibição do crescimento tumoral.³² Tanto células T CD4⁺ quanto CD8⁺ participam de forma independente na ação antitumoral do BCG, pois a supressão de uma das linhagens é suficiente para inibir a resposta. Podem ser verificados, também, marcadores de resposta imunológica como HLA-DR, CD25, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e complexo maior de histocompatibilidade - classe II (MHC-II).³³⁻³⁷ Dentre as células ativadas, parece que a destruição das células tumorais é executada por linfócitos CD8⁺CD56⁺ conhecidos como BCG *activated killer cells* (BAK). A produção dessas células é dependente da secreção de interleucinas do tipo Th1. Experimentalmente, a ativação de células BAK *in vitro* ocorre pela exposição do BCG às células mononucleares, provenientes de sangue periférico, por aproximadamente sete dias.

A vacina do BCG é muito segura quando utilizado no controle da tuberculose, o que justifica o seu uso atual inclusive em recém-nascidos, além de produzir resposta imune duradoura, fatos estes adicionais para elegê-la como vetor de vacinas recombinantes. Domínios imunogênicos de bactérias, vírus e parasitas têm sido expressos com sucesso no BCG, gerando cepas recombinantes (rBCG), as quais produzem resposta imune não só contra o bacilo da tuberculose, mas também, contra os patógenos cujas proteínas são expressas nesse rBCG. Com o objetivo de desenvolver vacinas multivalentes, a Dra. Luciana C. C. Leite (Instituto Butantan - São Paulo), em parceria com o Dr. Rino Rappuoli (Itália), desenvolveram um programa de vacinas recombinantes. Foi incluída nessa

estratégia a experimentação contra a *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) para o desenvolvimento de uma nova vacina.³⁸

A toxina *pertussis* (PT) é o principal antígeno presente nas vacinas acelulares relacionadas à imunização contra a *B. pertussis*. A toxina é composta por cinco subunidades: S1 corresponde ao domínio ativo e S2 a S5 são domínios de ligação.³⁹ A S1 da PT (S1PT) demonstrou ser o componente de maior imunogenicidade dentre as subunidades, capaz de promover reação passiva por anticorpos monoclonais anti-S1PT em camundongos infectados.⁴⁰ A subunidade S1PT induz à resposta humoral ou celular, em associação a vacinas de *Salmonella*, *E. coli*, *Streptococcus gordonii* e BCG.⁴¹⁻⁴²

Diferentes promotores têm sido utilizados para o desenvolvimento de BCG recombinantes, como proteínas de choque térmico (hsp60, hsp70), proteínas heterólogas, como o pAN (isolado de *M. paratuberculosis*), antígenos 18-kDa, 19kDa e 85^A (isolados de *M. tuberculosis*) e o promotor mutado da β -lactamase de *M. fortuitum* (pBlaF*).³⁷ No desenvolvimento do vetor da S1PT, introduziu-se o promotor mutado da β -lactamase de *M. fortuitum* (pBlaF*), o que permitiu a expressão de sua proteína heteróloga.⁴³ Nesse caso, a toxina *pertussis* (PT), subunidade S1, domínio ativo do principal antígeno presente nas vacinas acelulares, foi clonada e expressa no BCG após o componente tóxico da subunidade S1PT ter sido eliminado, através de mutação sítio específico, dando origem a PT-9K/129G.⁴⁴ O rBCG foi desenvolvido através da expressão da subunidade não-tóxica S1 (PT-9K/129G), sob o controle do promotor da β -lactamase de *M. fortuitum* (pBlaF*).³⁸ A fusão da sequência de sinalização (sinais de exportação) da β -lactamase com o vetor pLA73 (S1PT) deu origem ao rBCG-S1PT.³⁸

A construção do BCG recombinante S1PT consistiu nas seguintes etapas, conforme publicações prévias: o gene do antígeno heterólogo da toxina pertussis (S1PT) foi amplificado por PCR a partir de plasmídeos contendo o gene e clonados no vetor de expressão de micobactéria pLA73 contendo o promotor pBLaF*, com fusão com a sequência sinal da β -lactamase e o gene de resistência à kanamicina; foram, então, transformados por eletroporação e plaqueados em meio sólido para crescimento de micobactéria, contendo kanamicina, para seleção dos transformantes. Extratos protéicos foram preparados para análise da expressão do antígeno por *Western Blot*. Na revelação, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-toxina pertussis (Figura 2).⁴⁵

Testes em camundongos imunizados com a cepa rBCG-S1PT mostraram maior efeito protetor quando desafiados com dose letal de *B. pertussis*, em comparação com a vacinação do BCG nativo. Nesse experimento, foi observado que a produção de resposta imune Th1 foi mais vigorosa no grupo vacinado com a rBCG-S1PT.^{38, 46}

A potencialidade do uso dessa variante recombinante do BCG, como imunoterápico alternativo para o tratamento do câncer de bexiga, nos direcionou para a busca de modelos animais capazes de reproduzir o ambiente intravesical e a resposta imunológica anti-tumoral.

Figura 2 – Construção da vacina de BCG recombinante: utilizado o vetor de expressão pLA73, o qual possui a origem de replicação de *E. coli* e micobactéria, o gene de resistência à kanamicina, pBlaF* (códon de iniciação) e o gene da sequência de sinalização da β -lactamase.

Diversos modelos animais de tumor vesical foram estudados, destacando-se aqui os seguintes: o primeiro, utilizando-se camundongos, baseou-se na indução de tumor vesical pelo uso de substâncias carcinogênicas, por via oral, como o N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]-formamida (FANFT), que leva de oito a 11 meses para produzir o tumor vesical, com as desvantagens de ser um processo demorado e de poder induzir outros sítios primários de neoplasia; o segundo, heterotópico por

xenoinxerto, foi desenvolvido em camundongos imunodeficientes, sem timo, onde células de tumor urotelial de humano foram implantadas no tecido subcutâneo dorsal, com o inconveniente da impossibilidade do estudo da resposta imunológica do tipo celular, que é a principal desencadeada pelo BCG; e o terceiro tipo, por aloinxerto, onde a neoplasia foi, primeiramente, induzida por substâncias carcinogênicas administradas por via oral e após o desenvolvimento do tumor vesical, este foi isolado e as células implantadas em camundongos singênicos, por instilação intravesical, designado, assim, modelo ortotópico.⁴⁷⁻⁴⁹ Neste último modelo, destaca-se o que utiliza células da linhagem MB49, provenientes de tumor vesical de camundongo C57BL/6.⁴⁹ As células MB49 são conhecidas por direcionarem o sistema imune para resposta do tipo Th2, dificultando, assim, uma reação antitumoral mais efetiva. Esta importante característica também é encontrada em tumores vesicais de humanos, logo, o modelo animal com células MB49 apresenta resposta imune semelhante ao humano, favorecendo os estudos comparativos.⁵⁰⁻⁵²

Em vista do exposto, pretendemos estabelecer o modelo murino ortotópico de câncer vesical e avaliar, comparativamente, o efeito antitumoral da vacina rBCG-S1PT *versus* a de BCG no carcinoma urotelial de bexiga.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Comparar a eficácia do tratamento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo murino realizado com a cepa recombinante rBCG-S1PT em relação ao tratamento convencional com BCG.

2.2 Objetivos Secundários

- Estabelecer o modelo murino de carcinoma de bexiga ortotópico para estudo dos efeitos antitumorais do BCG recombinante.
- Avaliar, comparativamente, in vivo, o efeito antitumoral da vacina rBCG-S1PT versus a de BCG no carcinoma urotelial de bexiga através de análises morfométrica e imunohistoquímica da peça tumoral e do ensaio de sobrevivência.
- Comparar os padrões de resposta imunológica Th1 e Th2 induzidas na bexiga, após a instilação intravesical de rBCG-S1PT, BCG e SF, com a evolução do tumor.
- Comparar a atividade antitumoral dos esplenócitos provenientes dos camundongos tratados com a vacina rBCG-S1PT ou a de BCG.
- Analisar a capacidade das cepas rBCG-S1PT e BCG de estimular padrões de resposta imunológica tipos Th1 e Th2, na bexiga sem tumor.

3. MÉTODOS

Esquema dos Experimentos Realizados

Desenvolvimento do Modelo Animal de Tumor Vesical
(etapa inicial dos experimentos I e II)

Experimento I

Experimento II

Experimento III

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, número 757-6 de 24 de agosto de 2006 (ANEXO A).

3.1 Desenvolvimento do Modelo Animal de Tumor Vesical

O procedimento de desenvolvimento do modelo animal consistiu na primeira etapa dos experimentos I e II, descritos a seguir. Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*, Rodentia, Mammalia), fêmeas, adultas, pesando entre 15 e 18 g, com 8 a 10 semanas de vida, provenientes e mantidos nas condições padrão do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Utilizou-se a linhagem de células de tumor urotelial de bexiga MB49 de camundongo C57BL/6 (doadas pelo Dr. Yi Lou - Universidade de Iowa, EUA), a qual foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol/L L-glutamina, 50 U/ml penicilina, e 0,05 mg/ml estreptomicina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em estufa a 37 °C e 5% CO₂. A suspensão celular de MB49, corada com azul de *trypan*, foi quantificada em câmara de *Neubauer* ao microscópio, e somente suspensões com no mínimo de 90% de células viáveis foram usadas para implantação tumoral na bexiga.

A implantação das células tumorais seguiu o método descrito por Kadhim *et al.* (1997), com pequenas modificações descritas a seguir (Figura 3).⁵³ Os camundongos foram anestesiados através da injeção intraperitoneal (I.P.) de 100 µl de uma solução composta por 1,5 mg/100 µl de ketamina (Dopalen – AgribRANDS do Brasil – Paulínia / SP) e 0,1 mg/100 µl de xilazina (Anasedam - AgribRANDS do Brasil – Paulínia/SP (GORSKA 2000). Em seguida, os animais foram submetidos à cateterização

transuretral, com cateter de polietileno 24-*gauge* sem agulha. A seguir, procedeu-se à lesão química do epitélio vesical com 0,3 M de nitrato de prata (AgNO_3), seguido de lavagem com soro fisiológico (SF) e instilação intravesical de 0,1 ml de suspensão de células MB49 (5×10^5 células/camundongo).

Figura 3 – Instilação intravesical de 0,1 ml de suspensão de células MB49 (5×10^5 células/camundongo) após cauterização química do epitélio vesical com AgNO_3 .

Os animais foram acompanhados por quatro semanas, após o qual, todos foram sacrificados por deslocamento cervical e a bexiga retirada para realização de exame macroscópico para comprovação da presença de tumor.

EXPERIMENTO I

Após realizado o procedimento de implantação das células tumorais (conforme descrito no item 3.1.), iniciou-se, no dia seguinte (dia 1), a aplicação dos imunoterápicos. Setenta e cinco camundongos ($n=75$) foram transportados e confinados no biotério nível dois de Biosegurança do Laboratório de Biotecnologia IV do Instituto Butantan, onde procedemos à instilação intravesical dos imunoterápicos.

Os animais foram divididos em três grupos (25/grupo), a saber:

- **BCG**: tratados com 0,1 ml de suspensão e BCG (1×10^6 cfu/camundongo ressuspensas em SF);
- **rBCG-S1PT**: tratados com 0,1 ml de suspensão de rBCG-S1PT (1×10^6 cfu/camundongo ressuspensas em SF);
- **Controle**: instilado 0,1 ml de SF.

Para tal procedimento, os animais foram novamente anestesiados e tiveram a uretra cateterizada, como descrito anteriormente. Os tratamentos propostos para cada grupo foram realizados através de uma aplicação por semana, nos dias 1, 8, 15, 22, totalizando 4 aplicações. Durante todo o período de tratamento, os animais foram assistidos diariamente para avaliação de hematúria macroscópica.

3.2 Análise do Peso das Bexigas

No 29º dia, os camundongos foram sacrificados e as bexigas retiradas (Figura 4), pesadas em balança analítica de precisão e divididas em dois fragmentos, sendo que um foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer – 80 °C, e o outro fixado em formol tamponado 10%. O baço, usado para obtenção dos esplenócitos, foi removido e mantido em placa petri contendo meio de cultura RPMI1640 à 4 °C.

Figura 4 – Bexiga acometida por tumor observado durante cistectomia.

3.3 Análise de Hematúria

Observou-se diariamente o aparecimento de hematúria macroscópica nos camundongos que receberam implante de células tumorais MB49 e submetidos às instilações intravesicais de SF, BCG ou rBCG-S1PT.

3.4 Análise Anátomo-Patológica e Imunohistoquímica

Os fragmentos da bexiga dos camundongos foram, após fixação durante 24hs em formol tamponado, desidratados em concentrações crescentes de etanol (100%, 95% e 70%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3 μ m foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação anátomo-patológica.

A imunohistoquímica consistiu em desparafinização em xilol e hidratação dos cortes em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e finalmente em água. Os anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica foram o anti-

Antígeno Carcino-Embrionário (Dako-CEA, II-7 1:200), a anti-Citoqueratina 7 (CK7 OV-TL 12/30, 1:100), o p53 (DO7, 1:100) e anti-oncoproteína c-erbB2 (Her2/neu, 1:100), produzidos pela Dakocytomation (Glostrup, Denmark). E como anticorpo secundário foi utilizado o chicken polyclonal to Rabbit IgG H&L- biotinilado (Abcam Ltd., Cambridge, UK).

Para recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas no tampão específico para cada anticorpo (Tabela Anticorpos) e colocadas em panela à vapor a 95°C por 30 min. Após este período as lâminas foram retiradas do vapor e deixadas resfriando a temperatura ambiente, 20°C, dentro dos seus respectivos tampões, por 15 min e lavadas abundantemente em água corrente. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram mergulhadas em banhos de H₂O₂ (3%, Nalgon) 2 vezes por 10 min e após, lavadas abundantemente em água corrente. As lâminas foram mantidas em tampão Tris HCl pH 7,6 para impedir o ressecamento das mesmas até serem submetidas à incubação com o anticorpo.

As lâminas foram retiradas do tampão, o excesso foi secado com papel toalha ao redor do tecido, e deitadas em uma câmara úmida específica para reação de imunohistoquímica. O anticorpo primário diluído foi colocado sobre o corte e mantido a 4°C durante a noite.

No dia seguinte, a solução com o anticorpo primário foi retirada utilizando Tris HCl pH7 a 4°C por duas vezes. O anticorpo secundário biotinilado (Reagente 1B do Histostain-SP Kit AEC, Broad Spectrum, Invitrogen, EUA) foi aplicado sobre o material por 20 min a 20°C e as lâminas foram protegidas da luz. Após nova lavagem com Tris HCl pH 7,6 os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase a 20°C por 20 min. (Solução HRP, Horseradish

Peroxidase-Streptavidin, Histostain[®], Invitrogen, EUA). Em seguida, os cortes histológicos foram lavados novamente com Tris Hcl pH7,6 e para a revelação o material foi incubado numa solução de PBS pH 7,4 com diaminobenzidina 0,1% p/v (DAB, 3,3 diaminobenzidine, Sigma, EUA) durante 20 min.

Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente, realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 3 min, seguindo-se nova lavagem em água corrente. Os cortes foram tratados com água amoniacal 0,2% (3 passagens rápidas) e desidratados em três banhos de álcool (50%, 80%, 95% e 100%), seguidos de 4 banhos de xilol (5 min cada) e montados com lamínula.

3.5 Padrões de Resposta Imune Th1/Th2

Os padrões de resposta imune Th1/Th2 das bexigas dos diversos grupos foram analisados pela técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real. Sendo assim, os fragmentos vesicais congelados em nitrogênio líquido foram processados para a extração de RNA total (RNAt) pela técnica do Trizol[®] de acordo com instruções do fabricante (*GIBCO/BRL Life Technologies*, Inc.). Em seguida, as amostras de RNAt foram purificadas em colunas de sílica RNeasy seguindo-se as recomendações do fabricante (*QIAGEN*). A quantidade ($OD_{A260nm} \times 20$) e a pureza (OD_{A260nm}/OD_{A280nm}) do RNA extraído foram verificadas através de espectrofotometria. Em seguida, 1µg do RNAt foi convertido em DNA complementar (cDNA) através da reação da transcriptase reversa, usando-se a enzima *SuperscriptTM III* (*Life Technologies*), iniciadores oligo-dT e termociclador (MJ Research PTC-200 Thermocycler, Watertown, MA, USA).

Posteriormente, os cDNA de cada uma das amostras foram amplificados, usando-se os iniciadores para os seguintes genes IL-2, IL-5, IL-12p40, iNOS, TGF- β , TNF- α , INF- γ , IL-10 e IL-6 (anexo B).

Tabela 1 – Citocinas avaliadas conforme o padrão de resposta imune Th1/Th2

<i>Resposta Imune</i>	Citocinas Quantificadas (RT-PCR)				
<i>Th1</i>	IL-2	IL-12	IFN- γ	TNF- α	
<i>Th2</i>	IL-5	IL-6	IL-10	TGF- β	iNOS

Foram utilizados neste ensaio a solução *Universal PCR MasterMix* (Applied Biosystems Inc -USA) e o equipamento de 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo de quantificação baseado no *SYBR Green* (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os resultados de expressão dos genes analisados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH (anexo B). Foram utilizados iniciadores definidos por Overbergh, em 1999. O produto da amplificação foi gerado em 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos (s) de anelamento a temperatura particular de cada iniciador por 30s, e alongamento a 72 °C por 30s.

3.6 Ensaio de Viabilidade: Co-cultura Esplenócito – Célula Tumoral

Inicialmente, as células tumorais MB49 foram cultivadas em meio de cultura contendo RPMI 1640 (GIBCO Life Technologies), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg /ml) e 10% de soro bovino fetal, sendo mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5%. Após as células atingirem confluência foram tripsinizadas, contadas em câmara de *Neubauer* e tiveram sua viabilidade avaliada através da coloração de azul de *Trypan*. Procedeu-se, então, diluição celular, com RPMI 1640, na concentração de 1×10^5 células/ ml, seguida de semeadura em placa de cultura celular de 48 poços e incubadas por 24 horas.

Os baços que foram removidos dos camundongos tratados , foram masserados e passados por peneiras com porosidade de 70 µm (*Cell strainer*-BD Falcon, Bedford, MA). Os esplenócitos, assim obtidos, de cada grupo (SF, BCG e S1PT) foram lavados duas vezes em PBS e colocados em co-cultura, amostras em triplicata, com as células MB49 nas proporções de 10:1 e 50:1 por 18 horas.

Quantificou-se então a viabilidade das células MB49, utilizando-se o ensaio de citotoxicidade com *Alamar Blue*[®] (Biosource, Carlsbad, CA), conforme orientações do fabricante, onde metade do volume do meio da co-cultura foi substituído por novo RPMI 1640 contendo 20% de *Alamar Blue*[®], e mantido em incubação por 4 horas. A seguir, o nível de redução da solução foi medido (OD570- 600 nm) em leitor monocromador de microplacas da *SpectraMax* 340PC (Molecular Devices - USA).⁵⁴

Como controles internos do ensaio, foram utilizadas culturas de esplenócitos de cada um dos grupos em estudo, células MB49 vivas e mortas. Como parâmetro de

viabilidade 0% (morte) foi adicionado o detergente triton X 100 nas células MB49 na concentração final de 1%.

A viabilidade das células MB49 foi calculada baseada na seguinte equação:
$$\text{Viabilidade} = (\text{MBSp} - \text{Sp} - \text{MB}_D) / (\text{MB}_L - \text{MB}_D)$$
 quando $\text{MBSp} = \text{OD (570- 600 nm)}$ de MB49 + poço esplenócitos co-cultura, $\text{MB}_L = \text{OD (570- 600 nm)}$ do poço da MB49 viva em cultura simples, $\text{MB}_D = \text{OD (570- 600 nm)}$ do poço de MB49 morta e $\text{Sp} = \text{OD (570- 600 nm)}$ do poço de cultura de esplenócitos.

EXPERIMENTO II

3.7 Ensaio de Sobrevida

Neste experimento utilizamos 60 animais, divididos em 3 grupos de 20 camundongos cada. Procedeu-se como descrito no Experimento I, porém, os animais não foram sacrificados e, sim, acompanhados por 60 dias e, diariamente contabilizados os óbitos. A quantidade de células tumorais MB49 também diferiu, pois neste experimento implantamos 1×10^5 células por camundongo.

EXPERIMENTO III- Bexiga Sem Tumor

3.8 Análise Anátomo-Patológica e Padrões de Resposta Imune

Neste ensaio, procedeu-se como descrito no Experimento II (60 animais), porém não foi realizado o desenvolvimento do modelo animal (item 3.1.), ou seja, as células tumorais não foram implantadas, sendo os imunoterápicos aplicados em bexigas normais.

Adotamos a divisão dos animais nos três grupos já mencionados (controle, BCG e rBCG-S1PT) e, no 29º dia, as bexigas foram retiradas. Realizou-se, então, a análise anátomo-patológica, imunohistoquímica e padrões de resposta imune Th1/Th2.

4. RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento do Modelo Animal de Tumor Vesical

A taxa de implantação tumoral no Experimento I foi de 86,7% (65/75 animais) e de 91,7% (55/60 animais) no Experimento II, totalizando 88,9% de sucesso do modelo murino de câncer vesical (120/135). Os animais em que não foi evidenciado tumor através da análise anátomo-patológica foram excluídos da casuística (Figura 5), sendo 10 animais do Experimento I e 5 animais do Experimento II.

Figura 5 – Aspecto macroscópico do carcinoma urotelial no camundongo, após cistectomia.

EXPERIMENTO I

4.2 Análise do Peso das Bexigas

A análise descritiva do peso vesical médio dos animais com tumor demonstrou diferença entre os grupos, sendo que o grupo SF foi o que apresentou o maior peso médio, enquanto que o grupo rBCG-S1PT apresentou o menor. Também pudemos verificar que o grupo rBCG-S1PT apresentou menor variabilidade, verificada pelo desvio padrão de cada grupo (Gráfico 1).

Através de uma análise de variância (ANOVA-ONEWAY) foi observada diferença estatisticamente significativa do peso vesical médio entre os três grupos avaliados ($p < 0,001$) (Gráfico 1).

Tabela 2 – Análise das comparações múltiplas dos pesos vesicais entre os grupos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF

Grupo (I)	Grupo (J)	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	<i>p</i>
SF	BCG	84,0*	27,6	0,012
	S1PT	138,3*	22,5	0,000
BCG	SF	-84,0*	27,6	0,012
	S1PT	54,3	21,9	0,054
S1PT	SF	-138,3*	22,5	0,000
	BCG	-54,3	21,9	0,054

* $p < 0,05$

Dessa forma prosseguiu-se a análise através de comparações múltiplas de Tukey (Tabela 2), de onde se verificou que o grupo SF apresentou, em média, peso vesical estatisticamente maior do que o apresentado pelo grupo BCG ($p = 0,012$) e

rBCG-S1PT ($p<0,001$). A diferença média do peso vesical do grupo SF com o grupo BCG foi estimada em $84,0 \pm 27,6$ mg e em $138,3 \pm 22,5$ mg para o grupo rBCG-S1PT. Apesar da diferença média dos pesos dos grupos BCG e rBCG-S1PT apresentar diferença marginalmente significativa ($p=0,054$), há uma tendência de redução do peso vesical no grupo rBCG-S1PT, como evidenciado pelo Gráfico 1.

Gráfico 1 – Média e desvio padrão dos pesos vesicais dos camundongos com tumor urotelial ortotópico MB49 (em mg)

4.3 Análise de Hematúria

A avaliação da hematúria macroscópica nos modelos animais de tumor vesical tratados com SF, BCG ou rBCG-S1PT demonstrou aparecimento a partir do 8º dia após o implante tumoral nos três grupos (Figura 6).

A análise estatística comparativa entre os grupos demonstrou não haver diferença significativa entre o tempo médio para o aparecimento de hematúria entre os animais que receberam SF e BCG ($p=0,086$). No entanto, os animais tratados com rBCG-S1PT apresentaram hematúria posteriormente aos demais grupos, BCG ($p=0,027$) e SF ($p=0,039$), respectivamente (Gráfico 2).

Figura 6 – Hematúria macroscópica observada no 8º dia após o implante tumoral das células MB49, antes da segunda instilação intravesical (BCG, rBCG-S1PT ou SF), em camundongos C57BL/6.

Gráfico 2 – Aparecimento de hematúria macroscópica nos animais com tumor tratados com SF, BCG ou rBCG-S1PT

4.4 Análise Anátomo-Patológica e Imunohistoquímica

Na análise anátomo-patológica os três grupos desenvolveram tumor vesical com características semelhantes. Observou-se carcinoma urotelial infiltrativo difusamente na camada muscular própria e lâmina própria (Figuras 7A - D).

Figura 7 – Carcinoma urotelial infiltrativo difusamente na camada muscular própria, HE, X40 (A) e lâmina própria, HE, X400 (B). Carcinoma de alto grau, caracterizado por crescimento exofítico intravesical, HE, X40 (C). Carcinoma apresentando intenso polimorfismo nuclear e alta atividade mitótica, HE, X400 (D).

A análise imunohistoquímica evidenciou forte expressão em membrana celular para os marcadores CEA (Figura 8A) e CK7 (Figura 8B), de forma semelhante ao carcinoma urotelial de humanos. No entanto, não se detectou a expressão das proteína p53 e Her2/neu nas bexigas analisadas (Figuras 8C e 8D).

Figura 8 – Imunohistoquímica: carcinoma urotelial infiltrativo expressando CEA (A) e CK7 (B), X400; ausência de expressão para p53 (C) e Her2/neu (D), X400.

4.5 Padrões de Resposta Imune Th1/Th2

Nos grupos tratados com os imunoterápicos (BCG e rBCG-S1PT), observou-se aumento significativo da expressão de $\text{TNF-}\alpha$, sendo que os animais tratados com rBCG-S1PT apresentaram expressão relativa desta citocina significativamente maior que o grupo BCG ($p < 0,05$), compatível com uma tendência de maior estimulação da resposta imune do tipo Th1. Houve ainda elevação da expressão dos genes das IL-2 e IL12 no grupo rBCG-S1PT, porém sem significância estatística (Gráfico 3). Quando analisamos as interleucinas relacionadas ao padrão de resposta Th2, observamos aumento significativo de expressão de IL-10 nos grupos que receberam a variante recombinante do BCG. Houve ainda elevação da expressão do gene da IL-5 neste grupo, porém sem significância estatística (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Expressão gênica relativa (GAPDH), quantificada por *RT-PCR* em tempo real, referente à resposta imune Th1

Gráfico 4 – Expressão gênica relativa (GAPDH), quantificada por *RT-PCR* em tempo real, referente à resposta imune Th2

4.6 Ensaio de Viabilidade: Co-cultura Esplenócito – Célula Tumoral

A análise de citotoxicidade com a linhagem celular MB49 após 18h de co-cultura com esplenócitos de camundongos tratados com doses semanais de BCG, rBCG-S1PT ou SF, durante quatro semanas, evidenciou menor viabilidade das células tumorais frente ao BCG recombinante e ao SF, na proporção de 1:10. A avaliação das células tumorais na proporção de 1:50 demonstrou viabilidade significativamente menor do grupo rBCG-S1PT em relação aos demais. O teste estatístico utilizado foi a análise de variância ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Viabilidade das células tumorais MB49 em co-cultura com esplenócitos de camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF

EXPERIMENTO II

4.7 Ensaio de Sobrevida

A curva de sobrevida individual dos animais com tumor vesical apresentada no Gráfico 6 demonstrou diferença significativa entre o grupo tratado com rBCG-

S1PT e os demais grupos ($p < 0,05$). Os camundongos com tumor vesical tratados com BCG ou SF apresentaram sobrevida média semelhante (Teste estimador não-paramétrico de Kaplan-Meier).

Gráfico 6 – Curva de sobrevida dos camundongos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF, após implante intravesical de células tumorais MB49

Gráfico 7 – Sobrevida média dos grupos tratados com BCG, rBCG-S1PT ou SF, após implante intravesical de células tumorais MB49

O grupo de animais tratados com rBCG-S1PT também apresentou aumento significativo da sobrevida média (29,03%) em relação aos outros grupos (Gráfico 7).

EXPERIMENTO III – Bexiga sem tumor

4.8 Análise Anátomo-Patológica e Padrões de Resposta Imune

A histologia das bexigas submetidas a tratamento intravesical com BCG, rBCG-S1PT ou SF, na ausência do tumor vesical, demonstrou resposta tecidual semelhante entre os grupos. Observou-se, independentemente do tratamento recebido, leve infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e congestão vascular. (Figura 7 – A, B, C).

Figura 9 – Bexigas sem tumor, submetidas a tratamento intravesical com BCG (A), HE X100; rBCG-S1PT (B), HE X40; ou SF (C), HE X400

Na avaliação dos padrões de resposta imune com a aplicação tratamentos tópicos intravesicais, obtivemos o nível de expressão relativo das interleucinas da resposta Th1 e Th2, na bexiga sem tumor. Observou-se que a resposta desencadeada pela cepa recombinante do BCG apresentou elevação de IL-2, TNF- α (relacionadas ao padrão

imune do tipo Th1) e IL-10 (componente da resposta Th2) em comparação ao BCG nativo (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Expressão gênica relativa quantificada por *Real Time PCR* dos padrões de resposta imune Th1/Th2 dos grupos que receberam SF, BCG ou rBCG-S1PT com bexiga sem tumor

5. DISCUSSÃO

A imunoterapia em oncologia é a tentativa de curar ou modificar o crescimento tumoral através da intensificação da resposta imune do hospedeiro contra os antígenos tumorais. Os mecanismos imunorregulatórios proporcionados pela terapia do tumor vesical com BCG têm sido o foco de diversos estudos, porém ainda precisam ser mais bem definidos.⁵⁵

Pesquisas realizadas *in vivo* permitiram grande avanço no desenvolvimento de terapêuticas moduladoras de uma resposta imunológica mais efetiva. Os modelos animais propiciaram o estudo da fisiopatologia e da resposta imunológica tumoral frente às novas terapêuticas. Permitiram, também, uma maior amostragem de estudo e a possibilidade de avaliar efeitos colaterais de novos medicamentos que possam vir a ser utilizados em humanos.

Diversos modelos animais são descritos e aplicados no campo experimental, particularmente em relação ao tumor de bexiga. Em nosso estudo, utilizamos o modelo murino singênico ortotópico com a linhagem das células tumorais MB49, utilizado em diversos estudos devido às suas características bem estabelecidas.⁵⁶ Identificamos por imunohistoquímica a expressão das proteínas de membrana CEA e CK7, confirmando características semelhantes ao carcinoma urotelial de humanos. Porém, evidenciamos a ausência de expressão de p53 e anti-Her2/neu neste tipo celular. Dessa forma, podemos inferir que o padrão de resposta imunológica encontrado ao utilizarmos a linhagem celular MB49 possa ser semelhante ao do humano.⁵⁷⁻⁵⁸

A hematúria macroscópica foi observada precocemente no grupo tratado com BCG em relação ao controle e ao rBCG-S1PT ($p<0,05$). Esse fenômeno pode ter ocorrido no grupo BCG tanto por cistite inflamatória precocemente desencadeada pelo próprio bacilo, como também pelo crescimento tumoral inicial maior neste grupo. No entanto, este sinal de sangramento não deve ser considerado fidedigno como marcador para resposta ao tratamento, pois não há uma clara relação entre a agressividade ou invasividade do tumor com o aparecimento da hematúria.

A taxa de 90% de implantação tumoral das células MB49, obtida em nosso estudo, foi compatível com os relatos apresentados na literatura, onde os valores variam de 75 a 100%.⁵⁹ A análise anátomo-patológica confirmou o diagnóstico de carcinoma urotelial infiltrativo, o que também corroborou com a confirmação do estabelecimento deste modelo de câncer vesical.

Com os conhecimentos adquiridos no campo da imunologia, em especial sobre imunidade inata, surgiram importantes indícios da associação entre inflamação e câncer, transformando completamente o entendimento da fisiopatologia neoplásica.⁶⁰ Como se sabe, o câncer desenvolve-se por uma série de mudanças genéticas induzidas por fatores como vírus, drogas, radiações entre outros, que atingem um ou mais grupos de células, aumentando excessivamente sua capacidade de multiplicação e migração, invadindo tecidos vizinhos e órgãos a distância.⁶¹

A resposta imunológica é identificada em Th1 ou Th2 conforme o padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+ e CD8+. A resposta Th1 está ligada à imunidade celular, que protege o organismo contra agentes patogênicos específicos e toxinas, além de proporcionar ação antitumoral, enquanto que a Th2 favorece a resposta humoral, que é mediada pela ação de anticorpos. As duas respostas

interagem entre si, com efeitos inibitórios e/ou regulatórios, sendo que em indivíduos acometidos por neoplasia, observa-se uma modulação negativa da resposta do tipo celular.⁶²

A imunoterapia na forma de aplicação intravesical de BCG é utilizada para tratar e prevenir a recorrência e progressão do tumor não invasivo da bexiga.

Embora o mecanismo do efeito antitumoral do BCG não esteja completamente definido, há um consenso de que a aplicação intravesical de BCG cause uma reação inflamatória predominantemente do tipo celular. Desse modo, ocorrem ativação e infiltração de linfócitos T, induzindo uma maior produção de citocinas relacionadas à resposta Th1, principal responsável pelo seu efeito antitumoral. Há também estimulação da resposta Th2, como a liberação das citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, o que pode estar relacionado aos efeitos colaterais locais e sistêmicos da imunoterapia intravesical com BCG.^{31,63}

A evolução no campo da biologia molecular tem permitido o desenvolvimento de vacinas recombinantes, nas quais o material genético de interesse é inserido ou deletado, gerando uma nova cepa. Com isso, essa tecnologia visa aumentar a eficácia da terapia intravesical com imunoterápicos recombinantes. Conforme descrito anteriormente em relação à importância da resposta Th1 no mecanismo antineoplásico, diversas vacinas de BCG recombinantes criadas recentemente têm como foco principal a produção de citocinas que direcionem a resposta imune para o tipo celular. Arnold *et al.* (2004) demonstraram resultados promissores do BCG recombinante expressando γ -IFN (rBCG- γ -IFN) em ensaios com a linhagem celular MB49, com aumento significativo de sobrevida em relação ao controle, porém não houve diferença significativa entre o BCG e o rBCG- γ -IFN.⁶⁴

Outras formas de BCG recombinantes testadas em laboratório foram associadas a agentes potencializadores, como inibidores da ciclooxigenase 2 (Cox-2) e gemcitabina, com resultados, *in vitro*, demonstrando aumento da eficácia do BCG.⁶⁵⁻⁶⁷

Neste trabalho, comparamos o efeito do BCG convencional à variante recombinante BCG-S1PT, onde o PT é o fator central de virulência de *B. pertussis* e, tanto sozinho como combinado a outros antígenos, é o principal componente de todas as vacinas acelulares desenvolvidas até o momento. Em 2000, Nascimento *et al.*³⁸ relataram, em ensaio realizados *in vitro* com os esplenócitos de camundongos imunizados com rBCG-S1PT, elevada produção de IFN- γ e baixa de IL-4, caracterizando uma forte resposta celular Th1 antígeno-específica dominante.

Na presente investigação, procedeu-se à aplicação intravesical dos imunoterápicos nas bexigas previamente implantadas com células tumorais e quantificou-se a expressão gênica vesical, em nível de RNA. Analisamos cinco interleucinas que caracterizam resposta do tipo Th1 e quatro do tipo Th2. Observamos que tanto o grupo tratado com BCG quanto do rBCG-S1PT mostraram aumento na expressão de TNF- α em relação ao grupo controle, porém a cepa recombinante do BCG desencadeou uma resposta inflamatória de maior intensidade. O TNF- α é relacionado à sinalização da ação pró-inflamatória, caracterizando a fase aguda do processo inflamatório. Este processo é desencadeado pelos bacilos, os quais favorecem a ativação do sistema imune, lise direta do tumor, sinergismo para terapias antitumorais e necrose vascular.⁶⁸

Outro dado essencial observado foi o aumento significativo de IL-10 no grupo tratado com rBCG-S1PT, pois esta interleucina é considerada essencial no direcionamento da resposta imune para Th2 e/ou inibição da Th1. A IL-10 é também

considerada importante na modulação negativa da resposta imunológica de hipersensibilidade tardia.⁶⁹

A hipersensibilidade tardia pode ser verificada através do teste cutâneo com antígenos do BCG (PPD - derivado protéico purificado). Há evidências mostrando que a reatividade imunológica ao teste está relacionada ao sucesso do tratamento do tumor vesical com BCG.⁷⁰ Além disto, pode-se também verificar a relação da exposição prévia ao BCG e a eficácia do tratamento antitumoral. Podemos, portanto, inferir a significativa correlação entre a resposta imune do tipo hipersensibilidade tardia e o mecanismo de ação anti-neoplásico do BCG.⁶⁹

Em ensaios experimentais com a linhagem de células tumorais MB49 detectou-se que estas não produzem IL-10.⁷¹ Logo, os níveis por nós quantificados são provenientes da resposta local da bexiga dos camundongos, sem relação a linhagem celular escolhida para este ensaio.

Por outro lado, vários experimentos têm demonstrado efeitos contrários em relação ao IL-10 e a resposta imune ao câncer.⁷² Dependendo do modelo experimental, o IL-10 parece favorecer ou inibir a progressão do tumor. Em neoplasia gástrica, cólon, linfoma, e renal há correlação com pior prognóstico. Também, o IL-10 está relacionado diretamente à inibição do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos tumorais.⁷³

No entanto, conforme nossos resultados demonstraram, apesar do aumento de IL-10 com o uso do rBCG-S1PT, houve aumento significativo da curva de sobrevida e redução do volume tumoral neste grupo. Sugerimos, com estes achados, que o aumento de IL-10 no grupo do rBCG-S1PT tenha sido desencadeado como mecanismo modulatório à forte elevação do TNF- α . Dessa forma, o IL-10 estaria

participando de um mecanismo compensatório como fator limitante ao processo inflamatório excessivo, o que poderia impedir seus efeitos deletérios. Nosso achado é compatível com dados de estudos clínicos, que mostram a relação temporal entre a elevação das citocinas Th1 precedendo o aumento da expressão de marcadores da resposta Th2, como a IL-10, no paciente com tumor vesical recebendo imunoterapia intravesical.⁶⁹

O padrão de resposta Th1/Th2 expresso pelas bexigas submetidas à instilação intravesical com BCG, rBCG-S1PT ou SF, na ausência do tumor vesical, demonstrou que a variante do BCG recombinante gerou maior expressão das citocinas IL-2, TNF- α e IL-10 em comparação com o BCG nativo. No entanto, o exame anátomo-patológico demonstrou em ambos os grupos tratados, infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e congestão vascular, sem diferença entre os grupos.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que os esplenócitos dos camundongos tratados com rBCG-S1PT foram mais eficientes na destruição das células tumorais, sugerindo que as citocinas secretadas pelo estímulo do rBCG-S1PT com o sistema imune favoreceu uma maior produção de linfócitos BCG-ativados ou outras células efectoras. Luo *et al.*, em 2006, estudando a relação do estímulo da resposta Th1 na produção de citocinas induzida pelo BCG, mostrou que o TNF- α é o pivô central de resposta da citotoxicidade dos macrófagos contra as células de tumor vesical MBT-2.⁷⁴

Portanto, a imunoterapia com rBCG-S1PT demonstrou maiores benefícios para os camundongos com tumor vesical, evidenciado pelo aumento significativo da sobrevivência dos camundongos e pela diminuição do peso da bexiga, o que se relaciona com menor massa tumoral. Adicionalmente, os esplenócitos dos animais do grupo

recombinante exibiram maior citotoxicidade às células MB49, fatos esses que podem significar maior eficácia da vacina recombinante para o tratamento de tumor de bexiga.

As implicações práticas do presente estudo são claras. Os nossos dados sugerem que os pacientes com tumor não invasivo de bexiga poderão potencialmente se beneficiar imensamente com a utilização do BCG recombinante S1PT, tanto no sentido de evidenciarem menores índices de recorrência como de progressão subsequente da doença. Ademais, a ativação dos esplenócitos por ação da vacina de BCG recombinante talvez indique que esta possa exibir uma ação antitumoral sistêmica, auxiliando no combate à disseminação sistêmica das células tumorais.

Quanto às perspectivas abertas com o presente estudo, planejamos iniciar estudos clínicos de fase I e II em pacientes com carcinoma urotelial não invasivo de bexiga, procurando caracterizar os possíveis efeitos benéficos da vacina recombinante.

Outros dois projetos podem resultar da presente pesquisa. No primeiro estudo, pretendemos avaliar a possibilidade de inibir ou atenuar a produção da IL-10 pela vacina recombinante, de modo a produzir uma maior ação antitumoral. O outro projeto envolve a avaliação de um possível efeito terapêutico antineoplásico dos esplenócitos obtidos após a vacinação com BCG recombinante, explorando uma nova forma de terapia sistêmica em câncer de bexiga e outras neoplasias humanas.

6. CONCLUSÕES

De acordo com o protocolo experimental utilizado neste trabalho, concluímos que o tratamento do carcinoma urotelial de bexiga em modelo murino realizado com rBCG-S1PT é superior ao tratamento convencional com BCG, evidenciado principalmente por maior redução do peso tumoral e aumento de sobrevida.

Conclusões Específicas

- Obtivemos alta taxa de sucesso no estabelecimento do modelo singênico ortotópico de câncer vesical em murinos, utilizando a linhagem celular MB49.
- A caracterização histopatológica da linhagem MB49 demonstrou semelhanças imunohistoquímicas com o carcinoma urotelial vesical em humanos.
- A avaliação comparativa, *in vivo*, do efeito antitumoral da vacina rBCG-S1PT versus a de BCG no carcinoma urotelial de bexiga, através de análises morfométrica e imunohistoquímica da peça tumoral e do ensaio de sobrevida, apresentou dados que podem justificar o uso deste novo imunoterápico para o tratamento do câncer vesical, com potenciais vantagens sobre o BCG convencional.
- Os padrões de resposta imunológica induzidas na bexiga, após a instilação intravesical de rBCG-S1PT, foram predominantemente Th1,

com elevação significativamente maior do TNF- α neste grupo. Houve, também, participação do TNF- α e da IL-10 no mecanismo imunorregulatório antitumoral do rBCG-S1PT.

- A atividade antitumoral dos esplenócitos provenientes dos camundongos tratados com as vacinas resultou menor viabilidade das células tumorais no grupo rBCG-S1PT em relação ao grupo BCG.
- Não houve diferença significativa entre os padrões de resposta imunológica induzidos pelas cepas rBCG-S1PT e BCG, na bexiga sem tumor.

7. ANEXOS

8.1 ANEXO A: Protocolo da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24.08.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 757/06, intitulado: "Efeito antitumoral do bacilo Calmette-Guerin recombinante expressando o antígeno S1PT no carcinoma urotelial de bexiga", apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Priscila Maria de Andrade Borra
Pesquisador(a) Executante : Daher Cezar Chade

CAPPesq, 24 de Agosto de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

8.2 ANEXO B: Primers

IL2
R TCCAGAACATGCCGCAGAG
F CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA
IL5
R TCC AAT GCA TAG CTG GTG ATT T
F AGC ACA GTG GTG AAA GAG ACC TT
IL12p40
R AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG
F GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA
iNOS
R CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG
F CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT
TGF β
R GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
F TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G
TNF-α
R CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A
F TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC
INF-γ
F TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA
R TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG
IL10
F GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA
R ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT
IL6
F CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG TT
R GAA GTA GGG AAG GCC GTG G
GAPDH
F CAA CTC ACT CAA GAT TGT CAG CAA
R GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA

8.3 ANEXO C: Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-PCR) em tempo real

Etapas do uso do Software 7500 Fast System^R

8.3.1. Disposição das amostras na placa

8.3.2. Protocolo do termociclador

8.3.3. Gráfico da amplificação dos genes em tempo real

8.3.4. Tabela dos dados obtidos de cada animal

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	TNFa	TNFa	Standard	33.4296	1.46	0.5				85.6 °C
A2	TNFa	TNFa	Standard	34.7373	1.46	0.5				85.9 °C
A3	TNFa	TNFa	Standard	34.5338	1.46	0.5				85.9 °C
A4	IL-10	IL-10	Standard	29.2347	1.21	0.5				82.5 °C
A5	IL-10	IL-10	Standard	30.5673	1.21	0.5				82.9 °C
A6	IL-10	IL-10	Standard	30.4141	1.21	0.5				82.5 °C
B1	TNFa	TNFa	Standard	33.9375	1.46	0.25				85.6 °C
B2	TNFa	TNFa	Standard	34.3662	1.46	0.25				85.9 °C
B3	TNFa	TNFa	Standard	34.4605	1.46	0.25				85.9 °C
B4	IL-10	IL-10	Standard	28.0781	1.21	0.25				82.9 °C
B5	IL-10	IL-10	Standard	28.0104	1.21	0.25				82.9 °C
B6	IL-10	IL-10	Standard	27.9873	1.21	0.25				82.9 °C
C1	TNFa	TNFa	Standard	35.8473	1.46	0.125				85.9 °C
C2	TNFa	TNFa	Standard	34.8106	1.46	0.125				86.2 °C
C3	TNFa	TNFa	Standard	34.4712	1.46	0.125				86.2 °C
C4	IL-10	IL-10	Standard	28.0308	1.21	0.125				82.9 °C
C5	IL-10	IL-10	Standard	28.4383	1.21	0.125				82.9 °C
C6	IL-10	IL-10	Standard	28.229	1.21	0.125				82.9 °C
D1	TNFa	TNFa	Standard	36.3563	1.46	0.625				85.9 °C
D2	TNFa	TNFa	Standard	36.1856	1.46	0.625				86.2 °C
D3	TNFa	TNFa	Standard	37.5716	1.46	0.625				86.2 °C
D4	IL-10	IL-10	Standard	29.5852	1.21	0.625				82.9 °C
D5	IL-10	IL-10	Standard	29.2738	1.21	0.625				82.9 °C
D6	IL-10	IL-10	Standard	29.1146	1.21	0.625				82.9 °C
E1	TNFa	TNFa	Standard	37.8735	1.46	0.031				86.2 °C
E2	TNFa	TNFa	Standard	37.9822	1.46	0.031				86.2 °C
E3	TNFa	TNFa	Standard	36.0671	1.46	0.031				86.2 °C

8. REFERÊNCIAS

1. Stewart BW, Kleihues K. World Cancer Report. Lyon: IARC Press; 2003.
2. Kaasinen E, Rintala E, Pere AK, Kallio J, Puolakka VM, Liukkonen T, et al. Weekly mitomycin C followed by monthly bacillus Calmette-Guerin or alternating monthly interferon-alpha2B and bacillus Calmette-Guerin for prophylaxis of recurrent papillary superficial bladder carcinoma. *J Urol.* 2000;164:47-52.
3. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer.* 2000;89:630-9
4. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am.* 2000;27:1-13, vii.
5. Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. *Cancer Control.* 2000;7:325-34.
6. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology.* 2005;66(Suppl 1):90-107.
7. Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 2000;164:2129-33.
8. Calmette A, Guerin C: La vaccination preventive contre la tuberculose par le "BCG". *Paris Masson* 1927; 73: 79-86.
9. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 2008;179:53-6.
10. Pearl R: Cancer and tuberculosis. *Am J Hygiene* 1929; 9:97-102.
11. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 1959; 184: 291-7.
12. Ravenel MP, Jay AE. Luebeck Disaster. *Am J Public Health Nations Health.* 1932; 22: 296-297.

13. Zbar B, Bernstein ID, Rapp HJ. Suppression of tumor growth at the site of infection with living *Bacillus Calmette-Guerin*. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 46:831-9.
14. Mathe G, Cattani A, Amiel JL, Schwarzenberg L, Schneider M. Experimental therapeutic trials of leukemia and hematosarcomas: technologic and philosophic aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 1969;164:776-92.
15. deKernion JB, Golub SH, Gupta RK, Silverstein M, Morton DL. Successful transurethral intralesional BCG therapy of a bladder melanoma. *Cancer.* 1975; 36:1662-7.
16. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116:180-3
17. Coe JE, Feldman JD. Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea-pig bladder. *Immunology.* 1966;10:127-36.
18. Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1980;124:38-40.
19. Ikeda N, Honda I, Yano I, Koyama A, Toida I. *Bacillus calmette-guerin* Tokyo172 substrain for superficial bladder cancer: characterization and antitumor effect. *J Urol.* 2005;173:1507-12.
20. Koya MP, Simon MA, Soloway MS. Complications of intravesical therapy for urothelial cancer of the bladder. *J Urol.* 2006;175:2004-10.
21. Rischmann P, Desgrandchamps F, Malavaud B, Chopin DK. BCG intravesical instillations: recommendations for side-effects management. *Eur Urol.* 2000;37 Suppl 1:33-6.
22. Maffezzini M, Campodonico F, Canepa G, Capponi G, Fontana V. Short-schedule intravesical gemcitabine with ablative intent in recurrent Ta-T1, G1-G2, low- or intermediate-risk, transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2007;51:956-61
23. McKiernan JM, Masson P, Murphy AM, Goetzel M, Olsson CA, Petrylak DP, et al. Phase I trial of intravesical docetaxel in the management of superficial bladder cancer refractory to standard intravesical therapy. *J Clin Oncol.* 2006;24:3075-80.
24. Dalbagni G, Russo P, Bochner B, Ben-Porat L, Sheinfeld J, Sogani P, et al. Phase II trial of intravesical gemcitabine in bacille *Calmette-Guerin*-refractory transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol.* 2006;24:2729-34.

25. Dalbagni G, Russo P, Sheinfeld J, Mazumdar M, Tong W, Rabbani F, et al. Phase I trial of intravesical gemcitabine in bacillus Calmette-Guerin-refractory transitional-cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol*. 2002;20:3193-8.
26. de Reijke TM, Kurth KH, Sylvester RJ, Hall RR, Brausi M, van de Beek K, et al. Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer-Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). *J Urol*. 2005;173:405-9.
27. Lamm DL, Blumenstein BA, Crawford ED, Montie JE, Scardino P, Grossman HB, et al. A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med*. 1991;325:1205-9.
28. Bohle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*. 2003;169:90-5.
29. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*. 2005;174:86-91; discussion -2.
30. Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J Urol*. 2004;171:1343-7.
31. Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2003;170:964-9.
32. Ratliff TL, Ritchey JK, Yuan JJ, Andriole GL, Catalona WJ. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol*. 1993;150:1018-23.
33. Bohle A, Gerdes J, Ulmer AJ, Hofstetter AG, Flad HD. Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol*. 1990;144:53-8.
34. Prescott S, James K, Hargreave TB, Chisholm GD, Smyth JF. Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol*. 1992;147:1636-42.
35. Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, Skibinska A, Esuvaranathan K, Prescott S, et al. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 1995;99:369-75.

36. Lage JM, Bauer WC, Kelley DR, Ratliff TL, Catalona WJ. Histological parameters and pitfalls in the interpretation of bladder biopsies in bacillus Calmette-Guerin treatment of superficial bladder cancer. *J Urol*. 1986;135:916-9.
37. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*. 1991;351:456-60.
38. Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, 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.
39. Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure*. 1994;2:45-57.
40. Sato H, Sato Y. Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect Immun*. 1990;58:3369-74.
41. Abomoelak B, Huygen K, Kremer L, Turneer M, Locht C. Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein. *Infect Immun*. 1999;67:5100-5.
42. Barry EM, Gomez-Duarte O, Chatfield S, Rappuoli R, Pizza M, Losonsky G, et al. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in Salmonella typhi vaccine strain CVD 908. *Infect Immun*. 1996;64:4172-81.
43. Lee SF, March RJ, Halperin SA, Faulkner G, Gao L. Surface expression of a protective recombinant pertussis toxin S1 subunit fragment in Streptococcus gordonii. *Infect Immun*. 1999;67:1511-6.
44. Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, et al. Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science*. 1989;246:497-500.
45. Lim EM, Rauzier J, Timm J, Torrea G, Murray A, Gicquel B, et al. Identification of mycobacterium tuberculosis DNA sequences encoding exported proteins by using phoA gene fusions. *J Bacteriol*. 1995;177:59-65.
46. Nascimento IP, Dias WO, Quintilio W, Christ AP, Moraes JF, Vancetto MD, et al. Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against Bordetella pertussis intracerebral challenge. *Microbes Infect*. 2008;10:198-202.
47. Soloway MS. Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Cancer*. 1975;36:333-40.

48. Suttman H, Lehan N, Bohle A, Brandau S. Stimulation of neutrophil granulocytes with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. *Infect Immun.* 2003;71:4647-56.
49. Ratliff TL. Role of animal models in understanding intravesical therapy with bacille Calmette-Guerin. *Clin Infect Dis.* 2000;31 Suppl 3:S106-8.
50. Cardillo MR, Castagna G, Memeo L, De Bernardinis E, Di Silverio F. Epidermal growth factor receptor, MUC-1 and MUC-2 in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000;19:225-33.
51. Loskog A, Dzojic H, Vikman S, Ninalga C, Essand M, Korsgren O, et al. Adenovirus CD40 ligand gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor Microenvironment. *J Immunol.* 2004;172:7200-5.
52. Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK, Saxena S. Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:734-43.
53. Kadhim SA, Chin JL, Batislam E, Karlik SJ, Garcia B, Skamene E. Genetically regulated response to intravesical bacillus Calmette Guerin immunotherapy of orthotopic murine bladder tumor. *J Urol.* 1997;158:646-52.
54. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1998;213:157-67.
55. Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother.* 2007;61:299-305.
56. Summerhayes IC, Franks LM. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst.* 1979;62:1017-23.
57. Maluf FC, Cordon-Cardo C, Verbel DA, Satagopan JM, Boyle MG, Herr H, et al. Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. *Ann Oncol.* 2006;17(11):1677-86.
58. Vallmanya Llena FR, Laborda Rodriguez A, Lloreta Trull J, Cortadellas Angel R, Placer Santos J, Mas Gelabert A. [Immunohistochemical expression of p53, p21, p16, and cyclin D1 in superficial bladder cancer. A tissue microarray study]. *Actas Urol Esp.* 2006;30(8):754-62.

59. Gunther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, et al. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res.* 1999;59:2834-7.
60. Ito N, Fukushima S. Promotion of urinary bladder carcinogenesis in experimental animals. *Exp Pathol.* 1989;36:1-15.
61. Gonzalgo ML, Schoenberg MP, Rodriguez R. Biological pathways to bladder carcinogenesis. *Semin Urol Oncol.* 2000;18:256-63.
62. Thanhauser A, Bohle A, Schneider B, Reiling N, Mattern T, Ernst M, et al. The induction of bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1995;40:103-8.
63. Halak BK, Maguire HC, Jr., Lattime EC. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. *Cancer Res.* 1999 15;59:911-7.
64. Arnold J, de Boer EC, O'Donnell MA, Bohle A, Brandau S. Immunotherapy of experimental bladder cancer with recombinant BCG expressing interferon-gamma. *J Immunother.* 2004;27:116-23.
65. Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Treatment of bladder carcinomas using recombinant BCG DNA vaccines and electroporative gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:194-207.
66. Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J Urol.* 2004;171:1343-7.
67. Yu DS, Lee CF, Hsieh DS, Chang SY. Antitumor effects of recombinant BCG and interleukin-12 DNA vaccines on xenografted murine bladder cancer. *Urology.* 2004;63:596-601.
68. Bohle A, Thanhauser A, Ulmer AJ, Mattern T, Ernst M, Flad HD, et al. On the mode of action of intravesical bacillus Calmette-Guerin: in vitro characterization of BCG-activated killer cells. *Urol Res.* 1994;22:185-90.
69. Nadler R, Luo Y, Zhao W, Ritchey JK, Austin JC, Cohen MB, et al. Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediated antitumour activity. *Clin Exp Immunol.* 2003;131:206-16.
70. Kelley DR, Haaff EO, Becich M, Lage J, Bauer WC, Dresner SM, et al. Prognostic value of purified protein derivative skin test and granuloma formation in patients treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 1986;135:268-71.

-
71. Riemensberger J, Bohle A, Brandau S. IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:20-6.
 72. Giovarelli M, Musiani P, Modesti A, Dellabona P, Casorati G, Allione A, et al. Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *J Immunol*. 1995;155:3112-23.
 73. Kundu N, Beaty TL, Jackson MJ, Fulton AM. Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:536-41.
 74. Luo Y, Yamada H, Evanoff DP, Chen X. Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette–Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol*. 2006;146:181–8.

APÊNDICE

a) Publicações

I. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

Title: Immunomodulatory Effects of Recombinant BCG Expressing Pertussis Toxin on TNF-alpha and IL-10 in a Bladder Cancer Model
(enviado para publicação)

II. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations

Title: The therapeutic potential of Recombinant BCG Expressing the Antigen S1PT in the Intravesical Treatment of Bladder Cancer
(aceito para publicação)

III. Applied Cancer Research 2007;27(2):36-127

IV. International Braz J Urol. 2008; 34: 220-229

b) Apresentações em Congressos:

I. Congresso Brasileiro de Urologia

(27/Out – 1/Nov, 2007) Salvador, Bahia

II. XXVI Congresso Brasileiro de Patologia

(14 a 17 Nov, 2007) Bento Gonçalves, RS

c) Patentes:

(em andamento)

International Braz J Urol. 2008; 34: 220-229

ISSN 1677-5538

International

Braz J Urol

Official Journal of the Brazilian Society of Urology
Official Journal of the Confederación Americana de Urología
Official Journal of the Thai Urological Association
Volume 34, Number 2, March - April, 2008

Histopathological Characterization of a Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer Model (Page 224)

Full Text Online Access Available
www.brazjurol.com.br

INDEXED BY
PubMed

Histopathological Characterization of a Syngeneic Orthotopic Murine Bladder Cancer Model

Daher C. Chade, Priscila M. Andrade, Ricardo C. Borra, Katia R. Leite, Enrico Andrade, Fabiola E. Villanova, Miguel Srougi

Laboratory of Medical Investigation (DCC, PMA, KRL, EA, FEV, MS), Division of Urology, University of Sao Paulo Medical School, and Biodontology (RCB), Ibirapuera University, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Purpose: We developed and characterized by histopathology and immunohistochemistry a syngeneic murine bladder tumor model derived from the MB49 tumor cell line.

Materials and Methods: Bladder tumor implantation was achieved by intravesical instillation of 5×10^5 MB49 tumor cells in C57BL/6 mice. A chemical lesion of the bladder was performed in order to promote intravesical tumor implantation. The bladder wall lesion was accomplished by transurethral instillation of silver nitrate (AgNO_3). After 15 days, the animals were sacrificed, examined macroscopically for intravesical tumor and bladder weight. Histology and immunohistochemistry were performed using cytokeratin 7 (CK7), carcinoembryonic antigen (Dako-CEA), p53 and c-erbB2 oncoprotein (Her2/neu). **Results:** Twenty-nine out of 30 animals (96.7%) developed intravesical tumors in a 15-day period. Macroscopically, the mean bladder weight was 0.196g (0.069-0.538g), 10 to 15 times the normal bladder weight. The immunohistochemical analysis showed significant membrane expression of CEA and CK7: a similar finding for human urothelial cancer. We also characterized absence of expression of p53 and anti-Her2/neu in the murine model.

Conclusions: High tumor take rates were achieved by using the chemical induction of the bladder tumor. Although electric cauterization is widely described in the literature for syngeneic orthotopic animal models, the technique described in this study represents an alternative for intravesical bladder tumor implantation. Moreover, the histopathology and immunohistochemical analysis of the murine bladder tumor model derived from the MB49 cell line showed a resemblance to human infiltrating urothelial carcinoma, allowing clinical inference from experimental immunotherapy testing.

Key words: bladder cancer; intravesical instillation; tumor cell line; mice/c57bl; experimental neoplasm
Int Braz J Urol. 2008; 34: 220-9

INTRODUCTION

Animal models provide a system for understanding basic biological questions. With animal models, adequate control of experimental design is possible so that rigorous experiments can be performed to test various hypotheses. In the case of testing therapeutic mechanisms, it is important to select a model that is

most analogous to the clinical setting so that observations can be readily transferred to clinical studies for validation (1).

A murine bladder tumor model may offer some of these characteristics, while having many controlled variables under laboratory conditions (2). This permits inference from experimental data, which can be helpful for clinical purposes. The murine bladder

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

tumor models may be a xenograft model (in immunodeficient mice) (3), a chemically induced bladder cancer model (4), or a syngeneic animal model (5).

The use of immunodeficient mice in bladder cancer research has allowed the implantation of human carcinomas in an animal model. In addition, it has demonstrated the importance of the immune system, in particular as regards T lymphocytes, in anti-tumor activity (6).

The chemically induced models were achieved by administering carcinogens such as N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT) in C3H/He mice (7) or 7,12-dimethylbenzanthracene in mice strain C57BL/6 (8). Although adequate for immunotherapeutic testing, a long period of time was required for carcinogen-induced bladder tumor growth.

The syngeneic animal models were developed with the objective of improving immunotherapeutic studies (9). It is characterized by the transplantation of carcinogen-induced bladder cancer into syngeneic immunocompetent mice (5,10). This murine bladder tumor model has been considered appropriate for this purpose, as it permits the possibility of mimicking intravesical conditions. Moreover, research can be improved by testing local tumor response to drugs in an immunocompetent host (11). Implantation of syngeneic tumor cells can be made subcutaneously (heterotopic model) or by intravesical instillation (orthotopic model), in the anatomical site.

In this study, our aim was to characterize the syngeneic orthotopic murine bladder cancer model derived from the MB49 tumor cell line by histopathology and immunohistochemistry. We focused on the urothelial histogenesis of the murine tumor in order to demonstrate its similarities to the human bladder tumor. Therefore, our findings may support its use as a useful experimental bladder tumor model for drug testing and new immunotherapeutic alternatives. In addition, we demonstrate the feasibility of the implantation of the tumor cell line MB49 by the chemical lesion of the bladder using silver nitrate, as described previously by Luo et al. (12). Silver nitrate was chosen for this purpose due to its controlled and stable characteristics. Similar effects may be achieved using ethanol and poly-L-lysine, but this was not tested in this series.

The markers used for immunohistochemistry testing were cytokeratin 7, carcinoembryonic antigen, p53 and c-erbB2 oncoprotein, all commonly used for evaluating human bladder tumor.

MATERIALS AND METHODS

Animals - Eight- to 10-week-old female C57BL/6 mice, weighing 15-20g, were provided by the Bioterism Center of the university and maintained at our animal care facility for 1 week prior to use. The mice were housed five per cage in a limited access area at a controlled room temperature, with food and water ad libitum. The experiments were approved by the institution's Ethics Board Council.

Preparation of tumor cells - Syngeneic bladder tumor cell line MB49 was kindly provided by Dr. Yi Lou (University of Iowa, USA). The cells were maintained in vitro culture (DMEM, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, at 37°C and 5% CO₂). Tumor cells were harvested by trypsinization and suspended in DMEM without L-glutamine, FBS, and antibiotics. Viability was determined by trypan blue exclusion and only tumor cell suspensions with more than 90% viable cells were used for tumor implantation.

Intravesical tumor implantation - Mice were anesthetized by the intraperitoneal administration of ketamine/xylazine solution at a dose of 0.1 mL/10g body weight. Subsequently, a 24-gauge Teflon i.v. catheter (Nipro®) was inserted through the urethra into the bladder using an inert lubricant (sterile contact gel) (Figure-1). Then, in order to prepare the bladder for tumor implantation, a brief acid exposure, followed by alkaline neutralization, promoted a chemical lesion on the bladder wall, performed by intravesical instillation of 8µl 1M silver nitrate (AgNO₃). This promoted an adequate and controlled diffuse bladder wall lesion. After 10 seconds, the content was washed out by transurethral infusion of phosphate-buffered saline. The first catheter was removed and a new 24-gauge catheter was inserted in the urethra for intravesical instillation of MB49 cells. A cell suspension of MB49 tumor cells (5 x 10⁵ cells in 0.1 mL 50% normal mouse serum) was instilled and retained for 2 hours by stitches.

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

Figure 1 – A 24-gauge catheter inserted in the urethra for intravesical instillation (female C57BL/6 mice).

The mice were evaluated on a daily basis for viability and gross hematuria. After 15 days, the animals were sacrificed by CO₂ inhalation, examined macroscopically for intravesical tumor and individually verified the bladder weight.

Histology and immunohistochemistry: After gross examination, the bladders were fixed in buffered formalin 10%, routinely processed and paraffin included and stained by hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was performed to characterize the immunophenotype and the antibodies used were cytokeratin 7 (CK7 OV-TL 12/30, 1:100), carcinoembryonic antigen (Dako-CEA, II-7 1:200), p53 (DO7, 1:100) and c-erbB2 oncoprotein (Her2/neu, 1:100), all produced by Dakocytomation, Glostrup, Denmark. Three-micrometer sections from the paraffin block containing tumor were placed on adhesive-coated slides. In a heat antigen retrieval process the slides were placed in a citrate buffer (1mM, pH 6.0) and heated for 30 min. in the steamer. The slides were incubated overnight at 4°C with the above antibodies. Labelled Streptavidin Biotin (LSAB; Dako Cytomation, CA,) at first biotinylated link universal for 35 min at room temperature, then the slides were rinsed with Tris-buffer for 5 min., incubated for a further 35 min. with streptavidin-HRP. The slides were rinsed in tap water for 5 min. Color was developed by incubating the slides in 0.06% diaminobenzidine in PBS for 15 minutes, and the slides were rinsed in Tris-buffer and

tap water, counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, cover slipped, and reviewed under light microscope. Tissue sections of a bladder urothelial carcinoma known to express p53 and Her2-neu, as well as pulmonary adenocarcinoma positive for cytokeratin 7 and CEA were used as positive controls. For each case a negative control was applied by following all steps of IHC except for replacement of the primary antibody by PBS.

RESULTS

All the animals survived the surgical intervention, no transmural bladder injury or bladder perforation was observed. All animals, after 7 days, presented evident gross hematuria (Figure-2), that persisted until the sacrifice on day 15. There was no obstruction of the urinary flow, except for the gross and intense hematuria. Considering all the animals (30) that received intravesical instillation of MB49

Figure 2 – Gross hematuria in a mouse, 7 days after the intravesical instillation of MB49 cells.

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

cells, 29 (96.7%) developed intravesical tumors after the 15-day period. At that time there was massive growth of a solid tumor inside the bladder.

Macroscopically the mean bladder weight was 0.196g (0.069-0.538g) in the tumor group, while a C57BL/6 mouse bladder weighs between 0.010g to 0.015g approximately. The tumor was represented by an usually solitary solid mass, growing inside the bladder, deeply red, soft and extremely bloody. There were areas of necrosis and superficial ulceration. Microscopically, there was a high grade urothelial solid carcinoma composed of proliferation of large, cubic cells, arranged in solid nests, with round, hyperchromatic nuclei and one or more nucleoli. Scattered giant, bizarre cells were seen in the tumor. The mitosis rate was high (50/HPF). Superficial ulceration and foci of necrosis were identified. In all cases the tumor was invasive through the bladder wall, reaching the muscularis propria. No vascular invasion or perineural infiltration was seen. The transition to normal urothelium was evident, and no in situ carcinoma was identified (Figure-3).

The immunohistochemical analysis showed strong, membrane expression of CEA and CK7: a similar profile that we commonly see for urothelial cancer that affects humans. Although p53 expression is very common in urothelial cancer, due to p53 mutation, in the murine model it does not seem to be a part of the carcinogenesis since we were unable to detect p53 staining. Also, we used antibody anti-Her2/neu, an oncogene super expressed in 30 to 60% of human urothelial carcinomas. There was no Her2/neu expression in the cases we have evaluated. The molecular evaluation of those two abnormalities among others should be the subject of our next study.

COMMENTS

As demonstrated above, the histological and immunohistochemical characteristics described in the murine bladder tumor model derived from the MB49 cell line mimics one of the main aspects of the human infiltrating urothelial carcinoma, which is defined as a urothelial tumor that invades beyond the lamina propria. By producing a pathologically similar

cancer to the human urothelial carcinoma, evidence from experimental research may become closer to data from human testing.

Considering the immunoregulatory mechanisms that participate in bladder tumor-host interaction (12), a wide field of research is open for investigation. Consequently, adequate local and systemic experimental environment model is required, allowing a significant conclusion to be obtained for further studies.

A murine bladder tumor model may offer some of these characteristics, while having many controlled variables under laboratory conditions. These factors permit inference from experimental data, which can be helpful for clinical purposes, specially considering safety issues.

Despite the technical difficulty of orthotopic tumor implantation, improvements have been made to avoid the variability of tumor cell adhesion to the bladder wall (5). Soloway et al. simulated a transurethral fulguration by cauterizing the murine bladder wall, creating conditions for tumor cells implantation (10). The development of this technical modification enhanced the model's applicability by transforming the orthotopic syngeneic bladder tumor model into a reliable tool for investigating tumor growth mechanisms and intravesical drug testing. Furthermore, the model closely resembles the clinical situation, making it very suitable for bladder cancer research.

The use of immunohistochemistry for accurate diagnosis of cancer has long been demonstrated (13). Determination of cytokeratins, in this situation, may be helpful in tumors poorly differentiated and for identifying the primary site of metastatic carcinomas (14). Moreover, IHC provides information on tumor progression, giving p53 expression among other markers, a significant prognostic value (15,16).

The murine bladder tumor model not only creates adequate conditions for understanding tumor adhesion, proliferation and invasiveness, but also allows the development of a cancer with many similar histopathological characteristics to the human urothelial carcinoma, making it a valuable tool for anti-tumor drug testing, based on immune, viral or gene therapy(9,17,18).

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

Figure 3 – A) High grade urothelial carcinoma, extensively infiltrative in the muscularis propria, HE X40 and B) X400. C) High grade urothelial carcinoma characterized by a exophytic growth through the vesical lumen, diffusely infiltrative in the lamina propria. Note the clear distinction between normal urothelium and tumor; HE, X40. D) High grade carcinoma characterized by large cubic cells, with intense nuclei polymorphism and high mitotic activity, HE, X400. E) Membrane immune expression of cytokeratin 7, X400, and F) CEA, X400.

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

CONCLUSIONS

The tumor implantation procedures described herein provide a reproducible experimental bladder cancer model. The orthotopic murine model has an important role improving our knowledge of therapeutic mechanisms of superficial bladder cancer in the proper anatomical site.

In conclusion, the histopathology and immunohistochemical profile of the murine bladder tumor model derived from the MB49 cell line resembles the human infiltrating urothelial carcinoma, allowing us to make inferences about its behavior and response to different treatment regimes.

ACKNOWLEDGEMENT

State of Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) provided financial support.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Böhle A, Brandau S: Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 2003; 170: 964-9.
2. Ratliff TL: Role of animal models in understanding intravesical therapy with bacille Calmette-Guérin. *Clin Infect Dis.* 2000; 31 Suppl 3: S106-8.
3. Hansson Y, Paulie S, Ben-Aïssa H, Rudberg U, Karlsson A, Perlmann P: Radioimmunolocalisation of bladder tumors xenotransplanted in nude mice. *Anticancer Res.* 1988; 8: 435-41.
4. Soloway MS: Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Cancer.* 1975; 36: 333-40.
5. Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, et al.: Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res.* 1999; 59: 2834-7.
6. Abe T, Tada M, Shinohara N, Okada F, Itoh T, Hama-da J, Harabayashi T, Chen Q, Moriuchi T, Nonomura K: Establishment and characterization of human urothelial cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Int J Urol.* 2006; 13: 47-57.
7. Mickey DD, Mickey GH, Murphy WM, Niell HB, Soloway MS: In vitro characterization of four N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT) induced mouse bladder tumors. *J Urol.* 1982; 127: 1233-7.
8. Summerhayes IC, Franks LM: Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62: 1017-23.
9. Wang H, Satoh M, Abe H, Sunamura M, Moriya T, Ishidoya S, et al.: Oncolytic viral therapy by bladder instillation using an E1A, E1B double-restricted adenovirus in an orthotopic bladder cancer model. *Urology.* 2006; 68: 674-81.
10. Soloway MS, Masters S: Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: influence of cauterization. *Cancer.* 1980; 46: 1158-63.
11. Fodor I, Timiryasova T, Denes B, Yoshida J, Ruckle H, Lilly M: Vaccinia virus mediated p53 gene therapy for bladder cancer in an orthotopic murine model. *J Urol.* 2005; 173: 604-9.
12. Luo Y, Chen X, O'donnell MA: Use of prostate specific antigen to measure bladder tumor growth in a mouse orthotopic model. *J Urol.* 2004; 172: 2414-20.
13. Debus E, Moll R, Franke WW, Weber K, Osborn M: Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 1984; 114: 121-30.
14. Cid Moureira P, Ortíz Rey JA, Antón Badiola I, San Miguel Fraile P, Alvarez Alvarez C, et al.: Coordinated expression of cytokeratin 7 and 20 in transitional carcinoma of the bladder: diagnostic usefulness. *Actas Urol Esp.* 2002; 26: 279-84.
15. Schrier BP, Vriesema JL, Witjes JA, Kiemeny LA, Schalken JA: The predictive value of p53, p27(kip1), and alpha-catenin for progression in superficial bladder carcinoma. *Eur Urol.* 2006; 50: 76-82.
16. McKenney JK, Amin MB: The role of immunohistochemistry in the diagnosis of urinary bladder neoplasms. *Semin Diagn Pathol.* 2005; 22: 69-87.
17. Moltedo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J, et al.: Immunotherapeutic effect of Concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved anti-tumor properties among hemocyanins. *J Urol.* 2006; 176: 2690-5.

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

18. Loskog AS, Fransson ME, Totterman TT: AdCD40L gene therapy counteracts T regulatory cells and cures

aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer model. Clin Cancer Res. 2005; 11: 8816-21.

*Accepted after revision:
February 22, 2008*

Correspondence address:

Dr. Miguel Srougi
Rua Peixoto Gomide, 2055 / 81
São Paulo, SP, 01409-003, Brazil
Fax: + 55 11 3257-8002
E-mail: srougi@uol.com.br

EDITORIAL COMMENT

The study presented by Chade et al. shows a nice modification of the previously published orthotopic MB-49 bladder tumor model.

The main difference to the model optimization published by Günther et al. (1999) is the initial bladder lesion before tumor cell instillation. In the previous model by Günther et al. mice were placed with their backs on the ground plate of the cautery unit. To optimize contact, electrocardiogram electrode contact gel was used. The soft-tipped end of a spring-wire guide of a 24-gauge central venous catheter was inserted into the bladder via a Teflon catheter and gently pushed forward until it reached the bladder wall. The guide wire was attached to a cautery unit and a monopolar coagulation was applied for 5 s at the lowest setting (5 W). After removal of the guide wire, 0.05 mL of the tumor cell suspension was instilled. Chade et al. induced instead of physical alteration of the bladder wall a chemical lesion with intravesical silver nitrate.

Furthermore, in the original description catheters were after tumor cell instillation pinched off with a clamp, kept locked with a Luer-Lock closing

cone, and left in place until the mice awakened. Using this method, a dwell time of approximately 3 h. was given.

Here, a dwell time of 2 hours was performed by temporary stitches (presumably of the urethra).

The effectivity of the described technique is comparable to the previous model. The tumor take was almost 100% and all animals developed gross hematuria. However, the number of animals with pulmonary metastases, which was 20-70% before, was not mentioned here.

Chade et al. examined the Her2/neu, p53, CK7, and CEA expression in this model. Interestingly, p53 and Her2/neu staining was negative. One has to be aware that this can also be due to antibody-related problems since immunohistochemistry staining procedures are frequently more difficult in mouse tissue than in human tissue. We have previously examined Ki-67 (TEC-3) expression and found in the tumors up to 70% positive cells (unpublished data).

In general, the molecular comparison between human bladder cancers and mouse models is very interesting since the results of therapeutic applications

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

may be easier to interpret. As the authors point out further molecular evaluations are planned. It would be highly interesting to perform these evaluations also in an humanized immune incompetent (SCID or Nude)

mouse model. However, we were until now not able, to transfer the intravesical model into SCID mice since most mice died after bladder wall coagulation. Maybe the technical modification of Chade et al. would lead to better results.

Dr. Ingo Kausch

*Department of Urology
University of Lubeck Medical School
Lubeck, Germany
E-mail: IngoKausch@uk-sh.de*

EDITORIAL COMMENT

Bladder cancer is well suited for experimental therapies due to the isolated bladder cavity in which therapies can be given locally. By transurethral noninvasive surgery, bladder tumors can easily be monitored and biopsies taken for further analyses. These features are beginning to attract a number of drug developers within a variety of fields including chemo-, immuno- and gene therapy. Bladder cancer is one of few cancers that have excellent orthotopic murine experimental models that are closely mimicking the clinical situation (1,2). Hence, in these orthotopic models, tumor biology can be studied and tumor therapy can be given locally by instillation via cauterization of urethra just as in the patients. In the current issue, Chade et al. are describing a novel system to enhance tumor take in experimental bladder cancer using silver nitrate (AgNO_3) as well as giving further insights into the biology of murine bladder tumors by performing a histopathological evaluation.

The most common murine bladder cancer cell lines are the mouse bladder-49 (MB49) and the mouse bladder tumor-2 (MBT2) cells (1-3). These two cell lines can be used in syngeneic C57BL6 and C3H mice, respectively. The cell lines are utilized to create subcutaneous, orthotopic or metastatic tumors. In one of the first orthotopic models electrocauterization was used for tumor take. The electric pulse created a burn wound to which MB49 cells attached and formed tumors. In this model, the effect of Bacillus Calmette-

Guérin (BCG) therapy has been extensively evaluated and immunological mechanisms found in this model have later been proven transferable to human systems (1,4). However, the electrocauterization model has a few drawbacks. The main issue is that it can be difficult to obtain the technical equipment necessary. Further, this model does not give 100% tumor take which increases the number of mice needed per treatment group and may mask the true result in some treatment groups where differences are slim. Many groups have tried to obtain similar or better tumor take by chemical pretreatment of the bladder surface prior instillation of tumor cells. Agents tested are for example ethanol and poly-L-lysine (PLL) (2). Ethanol functions as an irritant and theoretically removes the mucin layer in the bladder thereby facilitating tumor take. The latter, PLL, is a polycation that is thought to by its positive electrical charge become a bridge between the negatively charged urothelium and the tumor cells thereby aiding tumor attachment. PLL has so far been the only agent that repeatedly gives tumor take in all mice. In this issue, Chade et al has further improved the management of the orthotopic model via the use of AgNO_3 pretreatment of the bladders to irritate the bladder wall prior tumor cell instillation. The tumor take is similar to that of PLL but the model as such saves time since this agent only needs a few seconds of incubation compared to PLL that needs to be incubated in the bladder for 10-20 min. prior tumor

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

instillation. It will be of interest to evaluate effects of different therapies in this improved model.

The MB49 tumor cells have many similarities to its human equivalent in terms of antigens and immune escape mechanisms. The latter include infiltration of T regulatory cells in the growing tumor, expression of TGF, attraction of IL10-producing suppressor cells other than T regulatory cells etc (5-7). This makes the MB49 model excellent for evaluation of novel immunotherapies. The MB49 cells have expression of the male antigen HY and this antigen has been used as a pseudo tumor antigen when the cells are used in female mice (8). However, when antigen-directed approaches are evaluated, true tumor antigens need to be targeted. Carcinoembryonic antigen (CEA) is one of the first identified tumor antigens. It is expressed in about half of all human tumors, especially in adenocarcinomas (9,10). The results from Chade et al demonstrate that MB49 cells express CEA as do human bladder cancer. This antigen is often used in tumor immunotherapy and the MB49 model can, hence, serve as a model system not only for bladder cancer but for all CEA positive tumors.

The murine experimental MB49 model gives new insights to tumor progression, survival and immune escape in human bladder cancer. Currently, there are several novel therapies such as immune and gene therapy that are proven potent in the MB49 model and now translated into clinical Phase I and II trials. It is important to further investigate murine experimental models to simplify the techniques as well as to further enlighten biological phenomena that may be translated into human cancer and get us closer to better and more refined drugs.

REFERENCES

1. Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, et al.: Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res.* 1999; 59: 2834-7.
2. Loskog A, Ninalga C, Hedlund T, Alimohammadi M, Malmström PU, Tötterman TH: Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy. *Lab Anim.* 2005; 39: 384-93.
3. Torti SV, Golden-Fleet M, Willingham MC, Ma R, Cline M, Sakimoto Y, et al.: Use of green fluorescent protein to measure tumor growth in an implanted bladder tumor model. *J Urol.* 2002; 167: 724-8.
4. Suttman H, Riemensberger J, Bentien G, Schmaltz D, Stöckle M, Jocham D, et al.: Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res.* 2006; 66: 8250-7.
5. Loskog A, Dzojic H, Vikman S, Ninalga C, Essand M, Korsgren O, et al.: Adenovirus CD40 ligand gene therapy counteracts immune escape mechanisms in the tumor Microenvironment. *J Immunol.* 2004; 172: 7200-5.
6. Loskog AS, Fransson ME, Totterman TT: AdCD40L gene therapy counteracts T regulatory cells and cures aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer model. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 8816-21.
7. Loskog A, Ninalga C, Paul-Wetterberg G, de la Torre M, Malmström PU, Tötterman TH: Human bladder carcinoma is dominated by T-regulatory cells and Th1 inhibitory cytokines. *J Urol.* 2007; 177: 353-8.
8. Melchionda F, McKirdy MK, Medeiros F, Fry TJ, Mackall CL: Escape from immune surveillance does not result in tolerance to tumor-associated antigens. *J Immunother.* 2004; 27: 329-38.
9. Huang EH, Kaufman HL: CEA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2002; 1: 49-63.
10. Hørig H, Medina FA, Conkright WA, Kaufman HL: Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines. *Expert Rev Mol Med.* 2000; 2: 1-24.

Dr. Angelica Loskog, PhD

*Clinical Immunology Division
Rudbeck Laboratory, Uppsala University
Uppsala, Sweden
Email: angelica.loskog@klinimm.uu.se*

Histopathology of a Murine Bladder Cancer Model

EDITORIAL COMMENT

An animal model that closely resembles human bladder cancer is needed for preclinical studies on the pathogenesis of bladder cancer and the development of therapeutic strategies for treating this disease. This paper describes a syngeneic murine bladder tumor model that is developed by intravesical implantation of MB49 cells, a commonly used murine bladder cancer cell line of the C57BL/6 origin. The authors have established the experimental conditions that result in a high incidence of orthotopic tumor in mice (96.7%; 29 out of 30 mice on day 15). By using a small volume of silver nitrate to traumatize the urothelium, the authors have demonstrated the feasibility of this method for intravesical bladder tumor implantation.

The implanted animals developed a solid tumor inside the bladder that mimics human urothelial invasive carcinoma in histopathology. Immunohistochemical analysis showed the strong expression of cytokeratin 7 and carcinoembryonic antigen on the surface of MB49 tumor cells, which is similar to human urothelial cancer. These surface markers facilitate the identification of primary tumor when metastasis occurs. Although this model is feasible and provides a high rate of tumor intake, this model needs to be improved for its variability in tumor growth. Nevertheless, this model provides a useful means for the therapeutic studies of bladder cancer including immunotherapy, chemotherapy, and gene therapy.

Dr. Yi Luo

Department of Urology

University of Iowa

Roy J. and Lucille A. Carver College of Medicine

Iowa City, Iowa, USA

E-mail: yi-luo@uiowa.edu