

BCG $\Delta leuD$ /Ag85B AUMENTA CITOTOXICIDADE E ALTERA PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE BEXIGA

KARINE RECH BEGNINI^{1*}; CAROLINE RIZZI²; VINÍCIUS FARIAS CAMPOS¹; ODIR DELLAGOSTIN²; TIAGO COLLARES¹; FABIANA KÖMMLING SEIXAS^{1}**

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A utilização de Bacilo Calmette-Guérin (BCG) como tratamento para carcinoma superficial da bexiga constitui um dos grandes sucessos da imunoterapia. O câncer de bexiga é o quarto tipo de tumor mais comum em homens e o décimo primeiro mais comuns em mulheres (SIEGEL et al., 2011). Possui forte impacto econômico no sistema de saúde mundial e é responsável por aproximadamente 5% de todas as mortes por câncer (SIMONS et al., 2007). O tratamento padrão para câncer superficial de bexiga baseia-se em cirurgia endoscópica associada a terapia intravesical complementar (THALMANN et al., 2000). Instalações vesicais de *Mycobacterium bovis* BCG representam o tratamento vesical de escolha para este tipo de tumor, sendo considerado o tratamento padrão ouro para carcinomas *in situ* de bexiga (AMIRKHAH et al., 2009).

Embora seja a terapia intravesical mais eficaz no tratamento de tumores de bexiga, alguns problemas podem ocorrer levando ao surgimento de tumores intolerantes, resistentes ou recorrentes (GONTERO et al., 2010). Além disso, em alguns casos ocorrem complicações devido à utilização de uma bactéria viva atenuada, levando ao aparecimento de sintomas como febre, cistite, pneumonites e, em casos mais graves, sepse por BCG (SUTTMANN et al., 2006). O sucesso do BCG como agente imunoterápico vem promovendo o desenvolvimento de pesquisas que buscam maneiras de manter ou melhorar sua eficácia terapêutica, porém reduzindo o perfil de efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2010). Nesse sentido, a construção de cepas recombinantes que proporcionem maior estímulo do sistema imune e aumento do efeito antitumoral da bactéria constitui um dos principais focos de pesquisas em melhorias imunoterapêuticas do BCG (AMIRKHAH et al., 2009).

Os primeiros relatos a respeito da eficácia de BCG recombinante para vacinas de tuberculose foram explorados utilizando BCG superexpressando antígenos Ag85 (TRICCAS, 2010). O complexo Ag85, composto pelas proteínas Ag85A, Ag85B e Ag85C, é o principal antígeno compartilhado pelas cepas de BCG e *M. tuberculosis*. (MUSTAFA et al., 1998). Por serem antígenos superexpressos, existem evidências de que são capazes de aumentar a geração de peptídeos antigênicos, desencadeando processos que podem levar a apoptose (JAGANNATH et al., 2010).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar o perfil de citotoxicidade e expressão gênica em linhagem celular de câncer de bexiga, após tratamento com cepa de *Mycobacterium bovis* $\Delta leuD$ superexpressando a proteína antígeno 85B (Ag85B).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Três diferentes cepas de BCG foram utilizadas neste estudo: *M. bovis* BCG Pasteur; *M. bovis* BCG Pasteur $\Delta leuD$, cepa auxotrófica para o aminoácido leucina (BORSUK et al., 2007); e *M. bovis* BCG Pasteur $\Delta leuD/Ag85B$ (rBCG), cepa recombinante de BCG $\Delta leuD$ superexpressando do antígeno Ag85B. A linhagem celular de carcinoma humano de bexiga (5637) foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para confecção do rBCG, DNA genômico de *M. bovis* foi extraído de uma linhagem patogênica local e as sequências dos genes alvos selecionados foram amplificadas através da técnica de PCR para posterior clonagem nos vetores pAE, para obtenção das frações recombinantes da proteína Ag85B, e nos vetores pUP410 e pUS2000 para construção de BCG recombinante expressando Ag85B. As células transformadas foram selecionadas em meio seletivo (meio 7H10 contendo $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina ou desprovido de L-leucina) e cultivadas em meio líquido para avaliação da expressão da proteína recombinante.

Foram utilizados cultivos bacterianos em meio líquido (2×10^6 UFC mL^{-1}) para preparação dos tratamentos. Placas de cultivo contendo a linhagem celular 5637 (2×10^4 células por poço) foram inoculadas com os diferentes tratamentos de BCG durante 48 h. O efeito das cepas bacterianas sobre o crescimento *in vitro* da linhagem de carcinoma humano de bexiga 5637 foi avaliado através da técnica colorimétrica utilizando LIVE/DEAD cell viability assay® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Células vivas são capazes de absorver calceína e são analisadas pela emissão de luz verde fluorescente (488 nm). Por outro lado, células mortas absorvem brometo de etídio, que se difunde através da membrana permeável da célula inviável e se liga ao seu DNA, sendo detectadas pelo sinal fluorescente vermelho (546 nm). As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Cell[^]F (Cell-F, New York, USA), sendo os dados expressos em média \pm SEM de 6 observações em diferentes campos, cada campo contendo no mínimo 100 células.

Os perfis de expressão gênica após 48 h de tratamento com diferentes cepas de BCG foram avaliados por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Neste trabalho foram analisados genes relacionados a rotas apoptóticas (pró-apoptóticos: bax, AIF, Endo G; antiapoptóticos: *survivin*, bcl-2; efetores: caspase 3, caspase 8 e caspase 9), genes relacionados ao ciclo celular (p53 e p21) e genes relacionados a estresse oxidativo (enzimas antioxidantes CAT, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GST e TRX).

Os dados foram analisados utilizando-se one-way ANOVA, seguido por teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes em todas as análises. Os dados foram expressos como média \pm SEM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise da viabilidade celular mostrou que a cepa BCG Pasteur $\Delta leuD/Ag85B$ possui maior citotoxicidade frente à linhagem de carcinoma de bexiga, quando comparadas às cepas BCG Pasteur e BCG $\Delta leuD$ (Fig. 1). Os resultados também demonstram níveis superiores de expressão de genes pró-apoptóticos (bax, AIF e Endo G), caspases (caspase 3, 8 e 9) e genes relacionados com o ciclo celular (p53 e p21) após tratamento com BCG $\Delta leuD/Ag85B$. Níveis inferiores de mRNA de genes antiapoptóticos (bcl-2 e *survivin*) foram detectados após o mesmo

tratamento. Ainda, o tratamento com BCG Δ leuD/Ag85B também elevou os níveis de mRNA de enzimas antioxidantes (CAT, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e GPx) em linhagem de células de câncer superficial de bexiga (Fig. 2).

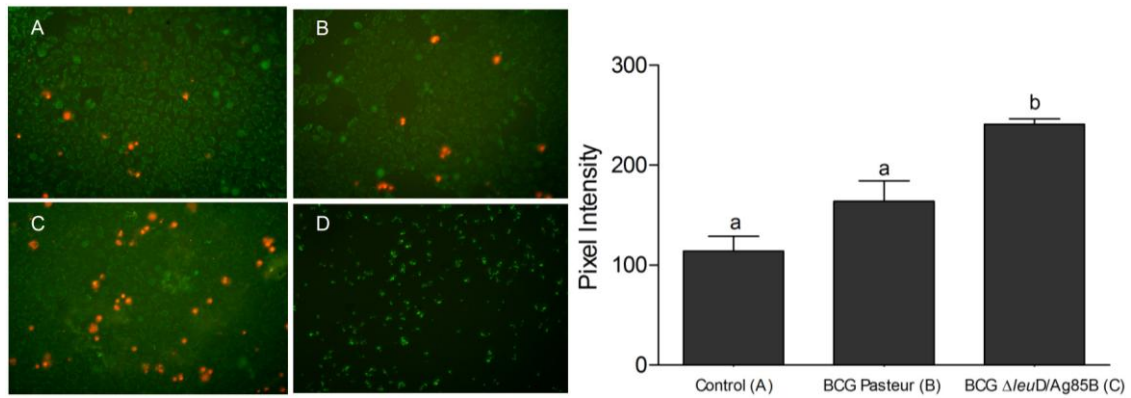


Figura 1: Tratamento com BCG Δ leuD/Ag85B aumenta a citotoxicidade em linhagem celular de carcinoma de bexiga. A análise quantitativa de morte celular foi realizada através de ensaio colorimétrico LIVE/DEAD. Células não tratadas (A); BCG Pasteur (B); BCG Δ leuD/Ag85B (C); cepas de BCG após 48 h de co-cultura com linhagem celular 5637 (D).

A perspectiva de modificar geneticamente as propriedades do BCG para criar um tratamento mais específico contra câncer de bexiga já é uma realidade (O'DONNELL, 2009) e linhagens rBCG são capazes de melhorar a eficácia da terapia existente (LIN et al, 2012; ANDRADE et al., 2010; LUO et al, 2004). Os resultados observados neste trabalho indicam que a proteína Ag85B apresenta propriedades que podem contribuir para a virulência micobacteriana, podendo estar relacionada com o aumento da citotoxicidade na linhagem celular de câncer de bexiga, bem como da alteração do perfil de expressão gênica.

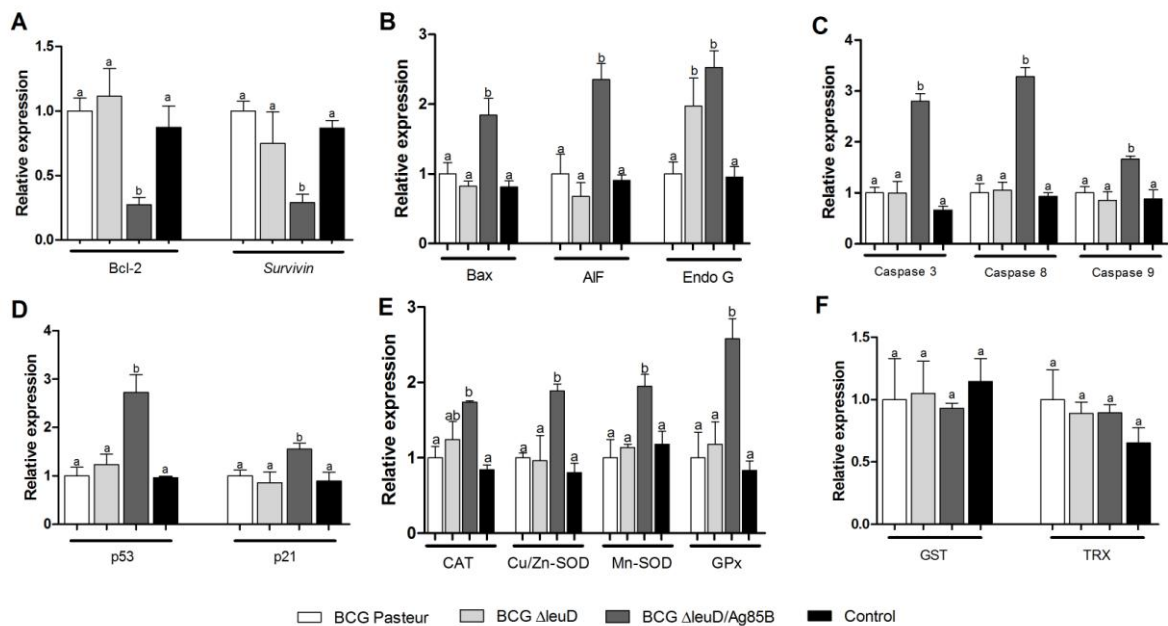


Figura 2: Tratamento com BCG Δ leuD/Ag85B altera o perfil de expressão gênica em linhagem celular 5637. Genes antiapoptóticos (A); genes pró-apoptóticos (B); genes efetores (caspases) (C); genes de ciclo celular (D); enzimas antioxidantes (E e F). Os dados estão expressos em médias de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que a cepa de BCG superexpressando Ag85B possui potencial antiproliferativo superior à cepa controle atualmente utilizada para imunoterapia de câncer superficial de bexiga, revelando a necessidade de novos estudos para comprovação de sua eficácia em imunoterapias. Este modelo terapêutico usando BCG recombinante possui potencial para uma futura aplicação clínica em tratamento de câncer de bexiga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIRKHAH, R.; KHANAHMAD, H.; ABOLHASSANI, M.; POOYA, M.; MOVASSAGH, H.; SHOKRGOZAR, M.A. Improvement of bladder cancer immunotherapy by creating a recombinant Bacille Calmette-Gu'erin which secretes p53 protein. **Med.Hypotheses**, v. 72, p. 754, 2009.
- ANDRADE, P.M.; CHADE, D.C.; BORRA, R.C.; NASCIMENTO, I.P.; VILLANOVA, F.E.; LEITE, L.C.; ANDRADE, E.; SROUGI, M. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urol.Oncol.**, v. 28, p. 520-525, 2010.
- BORSUK, S.; MENDUM, T.A.; FAGUNDES, M.Q.; MICHELON, M.; CUNHA, C.W.; MCFADDEN, J.; DELLAGOSTIN, O.A. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. **Tuberculosis** (Edinb), v. 87, p. 474-480, 2007.
- GONTERO, P.; BOHLE, A.; MALMSTROM, P.U.; O'DONNELL, M.A.; ODERDA, M.; SYLVESTER, R.; WITJES, F. The role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. **Eur.Urol.**, v. 57, p. 410-429, 2010.
- JAGANNATH, C.; LINDSEY, D.R.; DHANDAYUTHAPANI, S.; XU, Y.; HUNTER, R.L.; EISSA, N.T. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. **Nat.Med.**, v. 15, p. 267-276, 2009.
- LIN, C.W.; SU, I.J.; CHANG, J.R.; CHEN, Y.Y.; LU, J.J.; DOU, H.Y. Recombinant BCG coexpressing Ag85B, CFP10, and interleukin-12 induces multifunctional Th1 and memory T cells in mice. **APMIS**, v. 120, p. 72-82, 2012.
- LUO, Y.; YAMADA, H.; CHEN, X.; RYAN, A.A.; EVANOFF, D.P.; TRICCAS, J.A.; O'DONNELL, M.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing mouse IL-18 augments Th1 immunity and macrophage cytotoxicity. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 137, p. 24-34, 2004.
- MUSTAFA, A.S.; AMOUDY, H.A.; WIKER, H.G.; ABAL, A.T.; RAVN, P.; OFTUNG, F.; ANDERSEN, P. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand.J.Immunol.**, v. 48, p. 535-543, 1998.
- O'DONNELL, M.A. The genetic reconstruction of BCG as a new immunotherapeutic tool. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 512-517, 1997.
- SIEGEL, R.; WARD, E.; BRAWLEY, O.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J.Clin.**, v. 61, p. 212-236, 2011.
- SIMONS, M.P.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. **Immunol.Res.**, v. 39, p. 79-93, 2007.
- SUTTMANN, H.; RIEMENSBERGER, J.; BENTIEN, G.; SCHMALTZ, D.; STOCKLE, M.; JOCHAM, D.; BOHLE, A.; BRANDAU, S. Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. **Cancer Res.**, v. 66, p. 8250-8257, 2006.
- THALMANN, G.N.; SERMIER, A.; RENTSCH, C.; MOHRLE, K.; CECCHINI, M.G.; STUDER, U.E. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. **J.Urol.**, v. 164, p. 2129-2133, 2000.
- TRICCAS, J.A. Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis. **Bioeng.Bugs.**, 1, 110-115, 2010.